

Chemie und Eigenschaften von Kollagen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
am Fachbereich 21 Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wing-Hong Chik
aus Hongkong

Berlin 1975

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Chemie und Eigenschaften von Kollagen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
am Fachbereich 21 Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Wing-Hong Chik
aus Hongkong

Berlin 1975

Meiner Frau und der Familie Berthold Siegmund gewidmet



1. Referent: o. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider
2. Referent: Prof. Dr. G. Ruban

Tag der mündlichen Prüfung: 13.2.76.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung
von

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider
an der Freien Universität Berlin angefertigt.

Meinem sehr verehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider

möchte ich an dieser Stelle für die Stellung des Themas und
für sein ständiges großes Interesse an dieser Arbeit, für die
jederzeitige Förderung durch viele Ratschläge und Diskussionen
sowie für die Bereitstellung der notwendigen Mittel meinen
aufrichtigen Dank aussprechen.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	5
2. Übersicht	7
3. Isolierung und Reinigung von Kollagenen	11
3.1. Native Kollagene	11
3.2. Lösliche Kollagene	11
4. Identifizierung von Kollagenen	14
4.1. Prozentuale Bestimmung des Stickstoffs und des Hydroxyprolins im Kollagen	14
4.2. Gesamtaminosäureanalyse	21
4.3. Rasterelektronenmikroskopie	30
4.4. Infrarotspektroskopie	43
4.5. Die Methode der abgeschwächten Totalreflexion	47
4.6. Transmissions-Elektronenmikroskopie	48
4.7. Röntgenbeugungsstrukturanalyse	49
5. Eigenschaften des Kollagens	55
5.1. Denaturierung	55
5.2. Löslichkeit	57
5.3. Komponenten	58
5.4. Sedimentationsdiagramm	59
5.5. Wassergehalt	64
5.6. Tyrosingehalt	74
6. Aufbewahrung von Kollagenen	77
7. Zusammenfassung	93
8. Literaturverzeichnis	99

1. ENLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Kollagenfaser ist der hauptsächliche Faserbestandteil des Bindegewebes. Als Bindegewebe bezeichnet man das zwischen den Organen und Muskeln sich ausbreitende und sie umhüllende Gewebe. Dazu gehören beispielsweise die Haut und die inneren Membranen des Körpers, die Knorpel, die organische Grundsubstanz des Knochens und der Zähne, das Synovialgewebe, große Teile der Lymphdrüsen und der Gefäßwände (27). Das Kollagen besitzt viele bemerkenswerte Eigenschaften; so ist z.B. seine Zugfestigkeit mit der von Metallen vergleichbar. Das Kollagen der Hornhaut des Auges besitzt die Durchsichtigkeit des Wassers. Es ist maßgebend beteiligt an der Zähigkeit des Leders und des Knochenleims und bewirkt die Viskosität von Gelatine. Es tritt meist als einzelnes, unverzweigtes Faserbündel auf, das im Durchmesser von Gewebeart zu Gewebeart variiert. Unter einem normalen Mikroskop erscheint die Faserstruktur relativ ungeordnet, bei Betrachtung größerer Gewebestücke ist jedoch ein Ordnungsprinzip erkennbar. Die Durchsichtigkeit der Hornhaut hängt von der regelmäßigen Anordnung der Kollagenfibern ab, welche wahrscheinlich den gleichen Brechungsexponent besitzen wie der des umgebenden organischen Materials. Die Anordnung der Kollagenfibern der Knochen ist ähnlich der der Träger und Streben einer Brücke, und die Durchsetzung der Knochensubstanz mit anorganischen Stoffen folgt in seiner Richtung der Feinstruktur der Fibern. Im Knorpel sind die Fibern meist sehr dünn, zufallsorientiert und in einem großen Volumen einer extrazellulären Matrix eingebettet (24, 37, 22).

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit bildeten Untersuchungen über die Chemie und Eigenschaften von Kollagen. Zur Untersuchung wurden verschiedene Arbeitsmethoden durchgeführt, wie z.B. Extraktion von Kollagen, Gefriertrocknung, prozentuale Bestimmung des Stickstoffs und des Hydroxyprolins im Kollagen, Gesamtaminosäureanalyse, Rasterelektronenmikroskopie, Infrarotspektroskopie,

Röntgenbeugungsstrukturanalyse, Disk-Elektrophorese, Säulenchromatographie und Ultrazentrifugieren.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, welche Isolierungsmethode für Kollagen am geeignetsten ist. Zur Untersuchung dieses Problems mußten mehrere Kollagenpräparate hergestellt werden. Der Vordergrund der Untersuchung bezieht sich auf die löslichen Kollagenpräparate. Es ergab sich nun die Frage, ob Gefriertrocknung eine richtige Methode zur Aufbewahrung von Kollagen ist. Von besonderem Interesse erwies sich weiterhin, ob sich der Einsatz eines neuen Konservierungsmittels, Phenonip, in Kollagenlösungen positiv gegen Mikroorganismen auswirkt. Für diese Untersuchung sind bis jetzt in der Literatur noch keine Meßwerte vorhanden. Gleichzeitig war die nähere Untersuchung der Zusammensetzung von Phenonip durch Massenspektrometrie, Gas-Chromatographie, Kernresonanzspektroskopie und Infrarotspektroskopie von Interesse.

Als Konservierungsmittel für Kollagenlösungen schien uns die Klasse der 4-Hydroxybenzoesäure-Alkylester, beispielsweise Nipagin M, besonders geeignet. Unter diesen Estern wird Phenonip bevorzugt, da Phenonip seit kurzer Zeit bekannt ist. Eine Übersicht über die 4-Hydroxybenzoesäure-Alkylester ist schon in der Arbeit von Wallhäüßer (68) angegeben.

Sieben Identifizierungsmethoden von Kollagen wurden herangezogen. Die Rasterelektronenmikroskopie ist bis heute noch nicht für die Identifizierung löslicher Kollagene eingesetzt worden. In dieser Dissertation sollte die Bedeutung der Rasterelektronenmikroskopie zur Untersuchung an Kollagen dargestellt werden. Es wurde geklärt, ob sich Transmissions-Elektronenmikroskopie durch Rasterelektronenmikroskopie ersetzen läßt. Eine andere Methode der Identifizierung von Kollagen ist Infrarotspektroskopie. Es ist interessant festzustellen, ob die Methode der abgeschwächten Totalreflexion eine bessere Methode für die Identifizierung ist als die Transmissions-Infrarotspektroskopie.

2. ÜBERSICHT

Die Kollagenfaser ist das hauptsächlichste Bauelement des Bindegewebes. Das Bindegewebe besteht neben wenigen Zellen, die zu seiner Erhaltung und zu seinem Aufbau notwendig sind (Fibroblasten, Mastzellen), aus Fasern, unter denen 1. Kollagenfasern, 2. die wesentlich dünneren, aber im chemischen Aufbau weitgehend mit Kollagenfasern übereinstimmenden Retikulinfasern und 3. die meist mengenmäßig stark zurücktretenden chemisch und physikalisch vollkommen verschiedenen Elastinfasern unterschieden werden (21). Fasern und Zellen sind eingebettet in die gallertige zwischen- oder Intercellularsubstanz, die durch einen hohen Gehalt an Glykoproteiden und Mucopolysacchariden gekennzeichnet ist und außerdem neben einer größeren Zahl in der Hauptsache Serumproteinen entsprechenden Eiweißstoffen (26) eine lösliche Vorstufe des Kollagens (Tropokollagen) enthält. Die Bildung von Kollagenvorstufen erfolgt innerhalb der Fibroblasten, die Bildung der Fibrillen extracellulär innerhalb der Zwischensubstanz, wobei die Einzelheiten dieses Übergangs noch nicht völlig aufgeklärt sind (38). Den sauren Mucopolysacchariden der Zwischensubstanz kommt offenbar eine wesentliche, aber bisher unbekannte Funktion für die Entstehung der Fibrillen zu. Das ergibt sich daraus, daß einer erhöhten Bildung der Fibrillen immer eine gesteigerte Synthese von Mucopolysacchariden vorausgeht (54).

Die Fasern des Elastins unterscheiden sich von den Kollagenfasern durch ihre vollkommen andere Aminosäurezusammensetzung (21), durch die hohe Dehnbarkeit und ihr Verhalten gegenüber Enzymen. Im nativen Zustand werden Kollagen und Elastin von den üblichen Gewebsproteinasen nicht, wohl aber von zwei verschiedenen spezifischen Enzymen, Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* und Elastase, einem Enzym in geringer Menge in der Pankreasdrüse, abgebaut. Nach Denaturierung durch Hitze und chemische Reagenzien ist Kollagen spielend für alle Proteinase verdaulich, während die Widerstandsfähigkeit des Elastins sich nicht ändert.

Charakteristisch für die Kollagenfasern sind weiterhin:

- a) Die sich von anderen Proteinen erheblich unterscheidende Aminosäurezusammensetzung. Sie ist gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an Glycin, welcher etwa einem Drittel der Menge aller Aminosäuren entspricht, weiter durch einen hohen Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin. Die Bestimmung von Hydroxyprolin ist somit eine viel verwendete Methode zur Ermittlung des Kollagengehaltes eines Gewebes (vgl. S.14). Neben Hydroxyprolin enthält Kollagen in geringer Menge auch Hydroxylysin. Hydroxyprolin und Hydroxylysin werden in anderen Proteinen nur sehr selten angetroffen.
- b) Die hohe Quellbarkeit und das Verhalten bei der Denaturierung. Bei letzterem Vorgang schrumpft die ursprünglich nur wenig dehnbare Faser auf etwa 1/3 ihrer Länge zusammen. Die geschrumpfte Faser ist gummielastisch (vgl. S. 55).
- c) Die hohe Widerstandsfähigkeit des nativen Kollagens gegenüber Proteasen. Lediglich Kollagenasen, die eine ausgesprochene Sonderstellung einnehmen, vermögen natives Kollagen anzugreifen.
- d) Das Röntgenbeugungsdiagramm des Kollagens (s.S.49). Die Kollagenfasern setzen sich aus Bündeln von Fibrillen zusammen. Diese Fibrillen sind nur aus einer einzigen Art von monomeren Molekülen, den Kollagenmolekülen, aufgebaut. Das Kollagenmolekül ist ein steifes Stäbchen von etwa 3000 Å Länge und 15 Å Durchmesser. An seinem Bau sind drei Peptidketten von je etwa 1000 Aminosäuren beteiligt. Jede Kette bildet eine linksgewundene Schraube. Die drei Ketten sind zusätzlich im Rechtssinn nochmals zu einer übergeordneten Schraube verdreht. Wasserstoffbindungen quer zur Faserachse sorgen für den Zusammenhalt der drei Peptidketten (56).

Die Existenz des aus drei Peptidketten aufgebauten Stäbchenmolekuls ist auf Grund des Zerfalls bei der Denaturierung bewiesen, wobei die aus einer Kette bestehenden α - , die aus zwei Ketten bestehenden β - und die aus drei Ketten aufgebauten γ - Komponenten erhalten

werden (s.S. 58). Von den drei Ketten sind nach Untersuchungen von Piez (52) zwei, die mit $\alpha 1$ bezeichnet werden, in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch. Die dritte, $\alpha 2$ genannt, unterscheidet sich dagegen von den anderen beiden. Besteht eine Vernetzung zwischen zwei $\alpha 1$ -Ketten, dann bezeichnet man das entstandene Dimere als $\beta 11$ -Komponente; liegt die Vernetzung zwischen einer $\alpha 1$ - und einer $\alpha 2$ -Kette, so liegt eine $\beta 12$ -Komponente vor.

Vorhandensein und Zahl kovalenter intermolekularer Quervernetzungen sind entscheidend für den Unterschied zwischen löslichem und unlöslichem Kollagen (s.S.11), aber auch zwischen dem reifen jugendlichen und älteren Kollagen (13,59). Für die Gerbung ist eine Einführung zusätzlicher intermolekularer Quervernetzungen, für die Gelatine-Herstellung umgekehrt eine Auflösung der vorhandenen Quervernetzungen charakteristisch.

Chemisch ist Kollagen gekennzeichnet durch die Anwesenheit von Hydroxylysin und Hydroxyprolin. Neben dem mengenmäßig bei weitem überwiegenden L-4-Hydroxyprolin sind auch kleine Mengen L-3-Hydroxyprolin aufgefunden worden (32, 49). In der vorliegenden Arbeit ist L-4-Hydroxyprolin durch Hydroxyprolin bezeichnet.

Zum Schluß sollen die Reifung und Alterung des Kollagens erörtert werden. Während die Synthese der Tripelhelix des Kollagens noch in der Zelle vor sich zu gehen scheint, geschieht die Zusammenlagerung der Moleküle zu den Fibrillen sowie der Verfestigung zu unlöslichem, reifem Kollagen im extrazellulären Raum (15). Während dieses Reifungsprozesses durchläuft das Kollagen die löslichen Vorstufen (s.S. 11 und S. 57), die so schonend aus dem Gewebe extrahiert werden können, daß sie in vitro die Fähigkeit zur Bildung von Fibrillen des nativen Typs behalten (vgl.S.34). Die löslichen Vorstufen des Kollagens treten bei jungen Organismen verstärkt auf. Mit zunehmendem Alter geht ihre Menge im

Bindegewebe zugunsten des unlöslichen Kollagens zurück. So nimmt z.B. das neutralsalzlösliche Kollagen in Häuten von Meerschweinchen, das bei jungen Tieren bis zu 10% des Gesamtkollagens beträgt, parallel zur Verringerung der Wachstumsrate der Tiere ab (23). Ebenso nimmt auch das säurelösliche Kollagen mit zunehmendem Alter ab, wenn auch nicht so schnell wie das neutralsalzlösliche Kollagen (50). Ähnliches gilt auch für Rinderhäute (28). Auch der unter denaturierenden Bedingungen lösliche Anteil des säureunlöslichen Kollagens geht mit steigendem Alter der Tiere zurück (29). Achillessehne vom alten Rind ist praktisch vollständig unlöslich. Aus solchen Befunden wurde geschlossen, daß das neutralsalzlösliche und säurelösliche Kollagen Vorstufen des unlöslichen Kollagen darstellen (51).

3. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON KOLLAGENEN

Es wurden 22 Kollagenpräparate zur Untersuchung der Chemie und Eigenschaften des Kollagens hergestellt.

1.) Natives Kollagen.

Kollagen R.T.T. (s.S. 32, 56)

Wistar-Ratten wurden anästhetisiert und getötet. Sehnenfäden wurden aus den Rattenschwänzen entzogen, getrocknet, mit Gold bedampft und im Rasterelektronenmikroskop beobachtet.

2.) Lösliche Kollagene.

A.) Neutralsalzlösliche Kollagene.

i) Kollagenlösung N (s.S. 78, 92)

Nach Entfernung von Blut, Fleisch und Fett wurde die Kalbshaut durch einen Fleischwolf zerrieben und drei bis fünf Tage bei 4°C dreimal mit fünffacher Menge 10% NaCl-Lösung extrahiert. Der Zusatz von Toluol verhütete die Einwirkung von Bakterien. Nach Zentrifugieren wurde die Lösung mit festem Ammoniumsulfat gesättigt und das Präzipitat abzentrifugiert. Bei Raumtemperatur wurde mehr Ammoniumsulfat als bei 4°C gelöst, und bei 3000 Umdrehungen pro Minute konnte schon das Protein von der Lösung getrennt werden, weil die Lösung eine höhere Dichte als die des Präzipitats besaß. In einer großen Menge Wasser wurde das Präzipitat gewaschen, abzentrifugiert und in 0,5 M Essigsäure gelöst. Durch Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 15% wurde das Kollagen ausgefällt und dann wieder in 0,1 M Essigsäure gelöst. Nach Zentrifugieren wurde die Lösung gegen 0,5 M NaCl-Lösung dialysiert. Nach Zugabe von NaCl zu 10% fiel das Kollagen aus. Das Präzipitat wurde in 0,4 M Essigsäure mit 0,5% Phenonip und 2,5% Tween 80 gelöst und eine halbe Stunde lang abzentrifugiert.

ii) Kollagenlösungen F₁ und F₂ (s.S. 78)

Die zerriebene Kalbshaut wurde 24 Stunden zweimal mit zehnfacher Menge von 0,02 M phosphatgepufferter 0,5 M NaCl-Lösung extrahiert.

Der verwendete Puffer war $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$. Nach Zentrifugieren wurde festes NaCl zu 20% in die Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde gerührt und eine halbe Stunde lang stehen gelassen. Das Präzipitat wurde nach Zentrifugieren bei 3000 Umdrehungen pro Minute in etwa zehnfacher Menge 0,05 M Essigsäure mit 0,1% Phenonip 2 Stunden lang gerührt. Die Lösung wurde nach Zentrifugieren über Nacht gegen 0,5 M NaCl, pH 7,4 (Phosphatpuffer) dialysiert. Nach Zugabe von festem NaCl zu 15% wurde das Präzipitat abzentrifugiert und in 0,4 M Essigsäure gelöst. Die Suspension wurde über Nacht gegen mehrmals gewechselte 0,4 M Essigsäure dialysiert und abzentrifugiert. Phenonip und Tween 80 wurden zu 0,5% bzw. 0,01% zugegeben.

iii) Kollagenpräparat Nr. 3 (vgl. S. 34, 59).

B.) Säurelösliche Kollagene

i) Kollagen Y (s.S. 15)

Die zerkleinerte Kalbshaut wurde 24 Stunden lang bei 4°C in doppelter Menge 0,1 M NaCl extrahiert. Nach Filtrieren durch eine Schicht des Nesseltuchs wurde die Haut 24 Stunden lang zweimal mit dreifacher Menge 0,1 M Essigsäure extrahiert. Nach weiterem Filtrieren wieder durch eine Schicht des Nesseltuchs wurde die Lösung abzentrifugiert. Durch Zugabe von 30% NaCl zu einer Endkonzentration von 7% NaCl wurde das Kollagen ausgefällt. Das Präzipitat wurde in 0,1 M Citratpuffer, pH 3,7, gelöst. Nach Zentrifugieren wurde die Lösung ca. drei Tage gegen Leitungswasser dialysiert und gefriergetrocknet.

ii) Kollagenlösungen C und D. (s.S. 78)

Die zerriebene Kalbshaut wurde 24 Stunden lang bei 4°C in doppelter Menge 0,1 M NaCl mit 0,3% Phenonip extrahiert. Nach Filtrieren durch eine Schicht des Nesseltuchs wurde die Haut 24 Stunden lang zweimal mit dreifacher Menge 0,1 M Essigsäure, die 0,3% Phenonip enthielt, extrahiert. Nach weiterem Filtrieren durch eine Schicht des Nesseltuchs wurde die Lösung abzentrifugiert. Durch Zugabe von 30% NaCl zu einer Endkonzentration von 7% NaCl wurde

das Kollagen ausgefällt. Nach Zentrifugieren wurde das Präzipitat in 0,1 M Essigsäure gelöst und abzentrifugiert. Durch Zusatz von Eisessig wurde die Säurekonzentration auf 0,4 M erhöht. Phenonip und Tween 80 wurden zu je 0,5% und 3% der Endkonzentration hinzugefügt.

iii) Kollagen A, Kollagen $K_3(K_1)$, Kollagen $K_3(K_2)$, Kollagenlösungen G 7 und G 8 (s.S. 15, 21, 35, 59, 66, 91).

0,1 M Essigsäure wurde als Extraktionsmittel verwendet.

iv) Kollagene $J_1, J_{1d}, J_{1t}, J_{1b}, J_{1f.t}, J_{1f.b}$ und J_2 (s.S. 34, 60, 74).

0,1 M Natriumcitratpuffer wurde als Extraktionsmittel verwendet.

v) Kollagene R.N., R.Ac. und R.Al.

Rattenhaut wurde verarbeitet.

C.) Alkalilösliches Kollagen.

Die Diaphysen des Kalbsschenkels wurden zerbrochen, 48 Stunden lang mit Chloroform-Methanol (3:1) entfettet, getrocknet und weitere 48 Stunden lang mit 0,2 M Natriumphosphatpuffer, pH 7, extrahiert. Die Zugabe von Toluol verhinderte die Einwirkung von Bakterien. Die Knochenstücke wurden mit Wasser ausgespült und in HCl bei pH 2,5 entkalkt. Nach fünf Tagen wurden die Knochenstücke weiter zerkleinert. Das entstandene Ossein wurde ausgespült, gefriergetrocknet und gemahlen. Nach dreitägigem Schütteln mit 5% NaOH-Lösung, die 0,1 M NaCl enthielt, wurde der pH-Wert auf 4 gebracht. Das entstandene Präzipitat wurde nach Zentrifugieren in 0,5 M Essigsäure gelöst und gegen das gleiche Auflösungsmittel dialysiert. Nach Zugabe von NaCl zu 4% wurde das ausgefallene Kollagen wieder in 0,5 M Essigsäure gelöst und gegen das gleiche Auflösungsmittel dialysiert.

4. IDENTIFIZIERUNG VON KOLLAGENEN

4.1. Prozentuale Bestimmung des Stickstoffs und des Hydroxyprolins im Kollagen

Die Identifizierung des in gefriergetrockneten Kollagenpräparaten oder in Kollagenlösungen vorhandenen Kollagens wurde unter Anwendung verschiedener Methoden durchgeführt. Die erste Methode beruhte auf der Bestimmung des Stickstoff- und Hydroxyprolingehalts im Kollagen. Die Arbeitsmethode zur Bestimmung des Stickstoffgehalts ergibt sich wie folgt:

Ein Kollagenpräparat, das 3 bis 7 mg Stickstoff enthielt, wurde gewogen und in einem Kjeldahlaufschlußkolben mit 0,12 g. Selenreaktionsgemisch und 8 ml konzentrierter N-freier Schwefelsäure versetzt. Der Kolben wurde in der Aufschlußapparatur auf 400°C erhitzt. Als das Reaktionsgemisch nach dem Abkühlen noch nicht farblos war, wurden einige Tropfen Perhydrol zur Lösung gegeben und erhitzt, bis sich die H_2SO_4 -Lösung vollständig entfärbte. Nach dem Abkühlen wurde die Aufschlußlösung mit 5 ml Wasser versetzt und in die Kjeldahlbestimmungsapparatur überführt. Durch Zugabe von 33%iger NaOH wurde das gebundene Ammoniak freigesetzt und mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation in eine Vorlage mit 0,1 N H_2SO_4 überdestilliert (ca. 15 Min.). Die nicht verbrauchte H_2SO_4 wurde mit 0,1 N NaOH aus einer 10 ml-Bürette zurücktitriert.

Da das reine aschefreie Kollagen $18 \pm 0,3$ Gew.% Stickstoff (Tabelle 1) enthält, wurde der Anteil des reinen aschefreien Kollagens im Kollagenpräparat rechnerisch ermittelt. Das Ergebnis war maßgebend bei der Berechnung des Hydroxyprolingehalts im reinen aschefreien Kollagen. Diese Berechnungsmethode gilt für die Werte von 12,9%, 13,7%, 12,3% und 12,8% in Tabelle 1, weil diese Berechnungsmethode für gefriergetrocknetes Kollagenpräparat am geeignetsten ist. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die

Fortsetzung auf S. 16

Tabelle 1. Hydroxyprolin- und Stickstoffgehalte von Kollagen in Kollagenpräparaten, die von Kalbshaut isoliert wurden.

Typ	N in Gew. %	Hyp. in Gew. % bzw. Reste/1000	Methode der Hyp. -Best.	Lit.
ASC ^a	18%	14%	Leach	63
ASC	18,3%	11,15%	Analysator ^b	10
ASC	--	98 Reste/1000	Analysator	20
ASC	--	88 Reste/1000	Analysator	9
NSC ^c	18,2%	9,6%	Analysator	10
Gelatine	--	14,4%	Neuman	46
Gelatine	17,7%	13,62%	Neuman	7
Gelatine G 7	--	93 Reste/1000	Analysator	--
	--	12,9% ^d	Leach (70°)	--
ASC G 7	--	87 Reste/1000	Analysator	--
	--	12,3%	Leach	--
ASC G 8	--	12,8%	Leach	--
ASC Y	--	13,7% ^e	Leach	--

Bemerkungen:

- (a) ASC ist säurelösliches Kollagen.
- (b) Analysator bedeutet Aminosäureanalysator.
- (c) NSC ist neutralsalzlösliches Kollagen.
- (d) Das Gelatinepräparat G 7 enthielt $79,8 \pm 0,3\%$ reines aschefreies hitzedenaturiertes Kollagen.
- (e) Das Kollagenpräparat Y enthielt 77,6% reines aschefreies Kollagen. 13,7% ist der mittlere Wert von 8 Bestimmungen.

Identifizierung des Kollagens in gefriergetrocknetem Zustand vorzunehmen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Hydroxyprolin-Bestimmung --- Leach (70°) --- war eine Modifikation der Methode nach Neuman und Logan (39,46). Die Arbeitsvorschrift ergibt sich folgendermaßen:

Ein Kollagenpräparat wurde durch 24-stündiges Erhitzen bei 100°C mit 6 N HCl in einem Schmelzrohr hydrolysiert. Vor dem Zuschmelzen wurde die Luft im Rohr durch N₂ vertrieben. Nach der Hydrolyse wurde das Hydrolysat im Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und auf eine Konzentration gebracht, die zwischen 5 bis 15 µg/ml Hydroxyprolin enthielt.

Die wichtigen Reagenzien in der Bestimmung waren:

6% H₂O₂ : 30% H₂O₂ wurde auf 6% verdünnt. Die H₂O₂-Lösung ist unbeständig, deshalb soll sie vor Gebrauch neu hergestellt werden.

5% p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung: p-Dimethylaminobenzaldehyd p.a. wurde in n-Propanol p.a. gelöst und im Dunkeln aufbewahrt.

L-4-Hydroxyprolin-Standardlösung: 50 mg. gut getrocknetes L-4-Hydroxyprolin wurden in 480 ml Wasser und 20 ml konz. HCl gelöst. Die Stammlösung wurde auf 5, 10 und 15 µg/ml Hydroxyprolin mit Wasser verdünnt.

Der Analysengang war:

1 ml der Analysenlösung wurde mit 1 ml 0,05 M CuSO₄ und 1 ml 2,5 M NaOH versetzt und kurz geschüttelt. Dann wurde 1 ml 6% H₂O₂ zugegeben. Die Gläser wurden geschüttelt und 10 Min in einem Wasserbad bei 70°C erwärmt, wobei die Reagenzgläser nach 5 Min nochmal geschüttelt wurden. Nach Zugabe von 4 ml 3 N H₂SO₄ und 2 ml 5% p-Dimethylaminobenzaldehyd wurden die Gläser wieder geschüttelt. Schließlich wurden sie 15 Min in einem Wasserbad von 70°C erwärmt und in kaltem Wasser abgekühlt. Die Extinktion jeder

Fortsetzung auf S.21

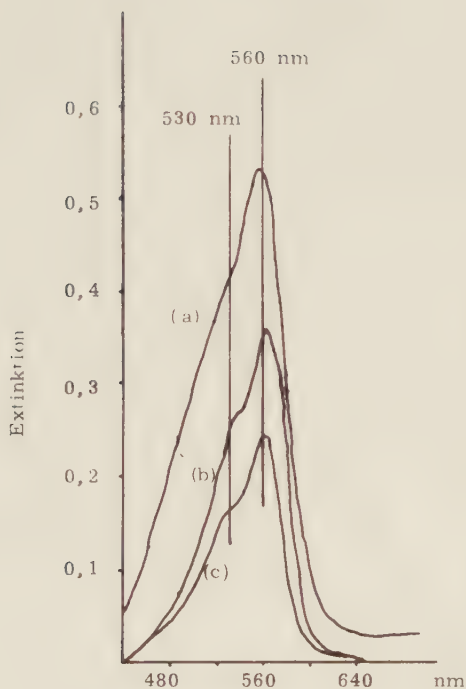


Abb. 1

Die Farbindensitäten der PAB-Reaktionen mit (a) frisch destilliertem Pyrrol, das mit CuSO_4 gemischt wurde, (b) dem Oxydationsprodukt nach der Methode von Woessner, und (c) dem Oxydationsprodukt nach der Methode von Leach, wobei die Oxydation bei 70°C stattfand.

PAB = p-Dimethylaminobenzaldehyd.

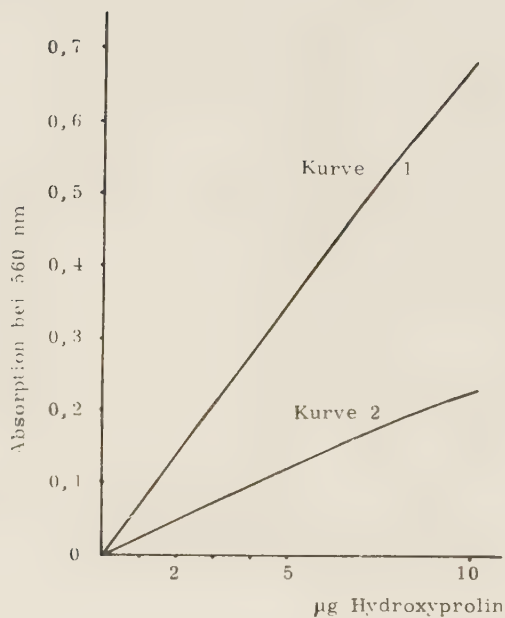


Abb. 2.

Für jede Hydroxyprolin-Bestimmung wurde eine Eichkurve graphisch dargestellt. Es wurde nach mehr als 25 Versuchen festgestellt, daß die Eichkurven in den meisten Fällen nicht völlig geradlinig verliefen. Diese Feststellung gilt für die Methoden nach Woessner (Kurve 1) und nach Leach (Kurve 2).

Extinktion

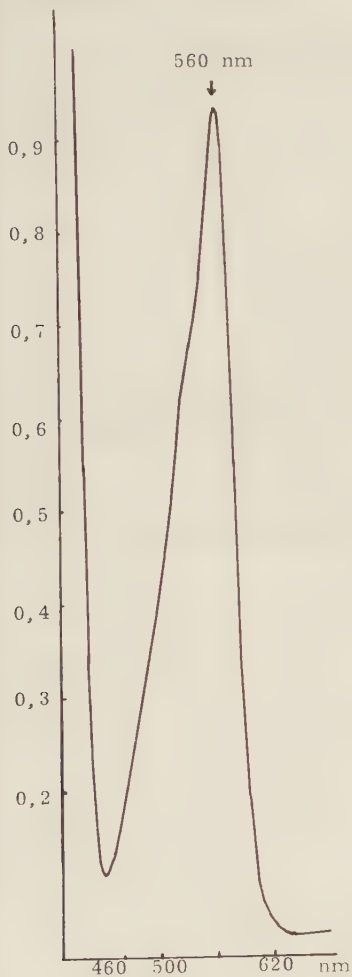


Abb. 3a.

L-4-Hydroxyprolin

Abb.3 Die Farbintensitäten der PAB-Reaktionen nach der Methode auf S.16 mit den Oxydationsprodukten von (a.) 0,2 mg L-4-Hydroxyprolin, (b.) 1,2 mg L-Prolin, (c.) 3,2 mg L-Tyrosin und (d.) 0,5 mg DL- δ -Hydroxylysin-HCl.

PAB = p-Dimethylaminobenzaldehyd.

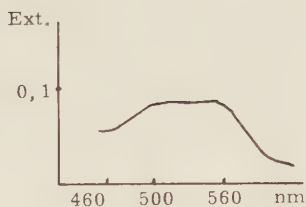
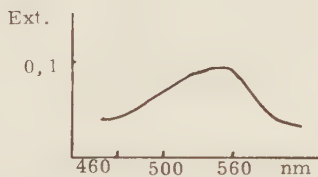


Abb. 3b.

L-Prolin



Nachdem die Farblösung in Abb. 3b mit Toluol extrahiert worden ist.

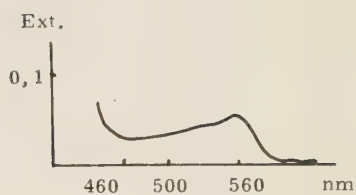
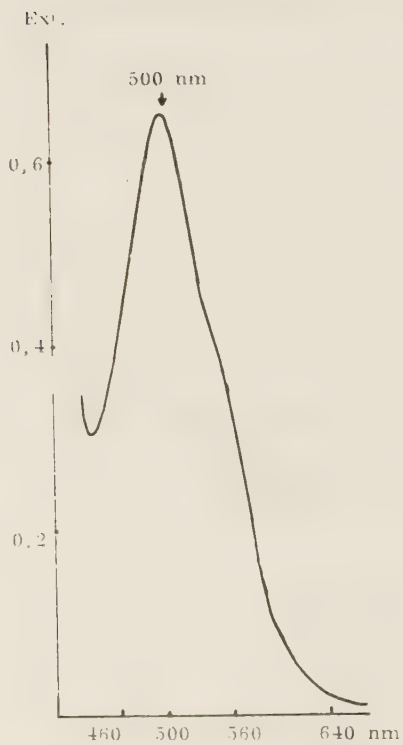


Abb. 3d.

DL-β-Hydroxylysine-HCl

Abb. 3c.

DL-β-Hydroxylysine

Lösung wurde nach 9 Min. bei 560 nm gegen einen Blindansatz gemessen (Abb.1 und 3).

Für jede Hydroxyprolin-Bestimmung wurde eine Eichkurve graphisch dargestellt, denn es zeigte sich, daß die Eichkurven in den meisten Fällen nicht völlig gerade waren (Abb.2). Diese Feststellung galt auch für die Methode der Hydroxyprolin-Bestimmung nach Woessner (33). Bei der Bestimmung nach Leach (70⁰) auf S.16 fand ich zufällig, daß DL- δ -Hydroxylysin nach der gleichen Behandlung wie Hydroxyprolin eine Farbe bildete, die ein sichtbares Spektrum besaß wie Hydroxyprolin, obwohl die Farbenintensität kleiner war als die von Hydroxyprolin. Dieser Befund ist bis jetzt nicht in der Literatur angegeben worden. Blumenkrantz N und Prockop (5) verwendeten NaIO_4 anstatt H_2O_2 in der Oxydation von Hydroxylysin und waren zu der Schlußfolgerung gekommen, daß Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure ein Zwischenprodukt war. Dieses Zwischenprodukt soll auch für die Oxydation mit H_2O_2 gelten.

4.2. Gesamtaminosäureanalyse

Als zweite Identifizierungsmethode diente die Anwendung des vollautomatisch arbeitenden Aminosäureanalysators. Der Aminosäureanalysator, Multichrom B (Beckman), wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Kollagen- und Gelatinepräparat G 7 wurden hydrolysiert und auf die Säule der Analysators gegeben. Die Reihenfolge der Citratpufferlösungen, die durch die Säule des Analysators flossen, war :

- (a) Puffer mit pH 3,18 für den Zeitraum von 0 bis 76 Minuten.
- (b) Puffer mit pH 4,45 für den Zeitraum von 77 bis 99 Min.
- (c) Puffer mit pH 6,25 für den Zeitraum von 100 bis 160 Min.

Die Fließgeschwindigkeit der Ninhydrinlösung war 50 ml pro Stunde. Die Farbintensitäten der Ninhydrinreaktion mit den getrennten Aminosäuren wurden bei 440 und 570 nm (34) automatisch registriert.

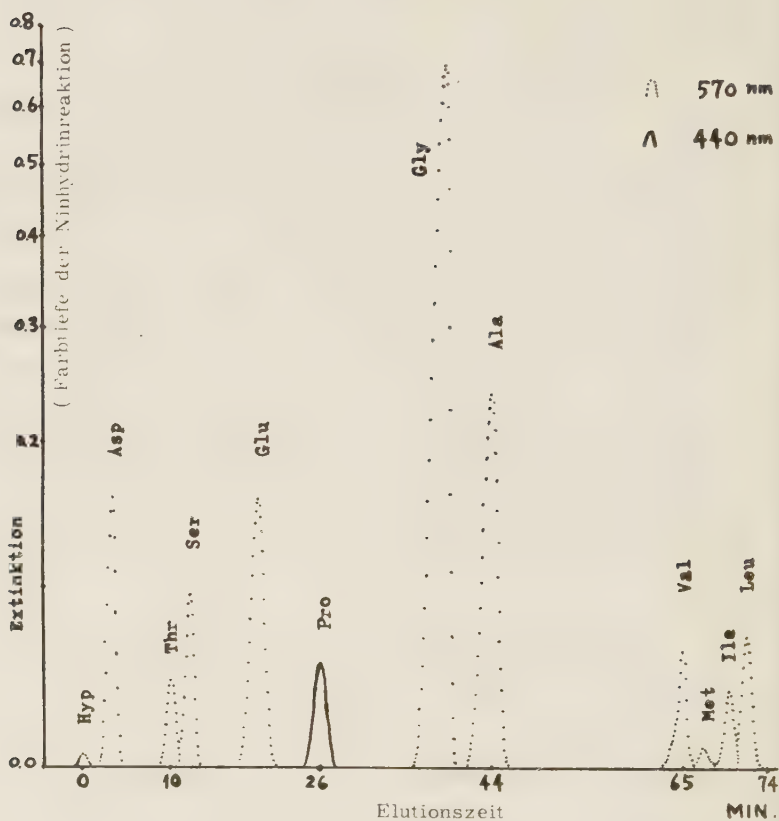


Abb. 4

Chromatogramm eines Gelatine-Hydrolysats (G 7) bei der Gesamtaminosäureanalyse mit dem Analysator Multichrom B (Beckman 42551).



Fortsetzung des vorigen Chromatogramms (Abb. 4)

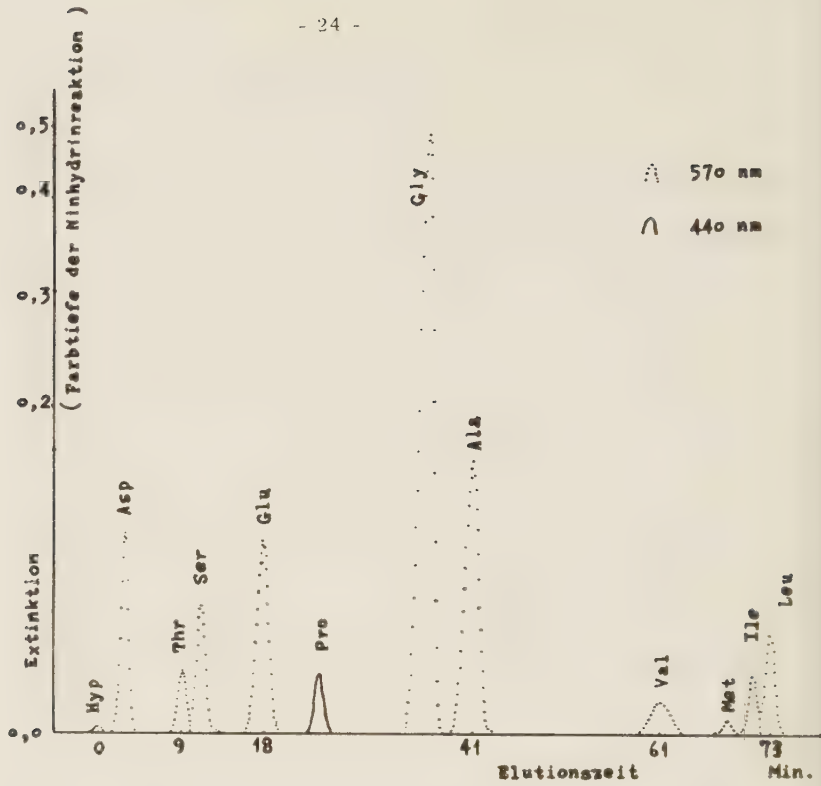
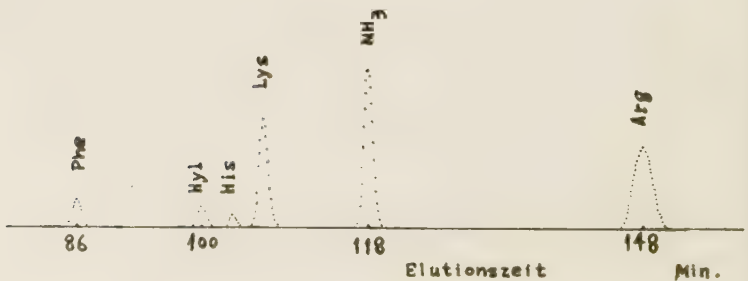


Abb.5. Chromatogramm eines Kollagenhydrolysats G 7 bei der Gesamtaminosäureanalyse.



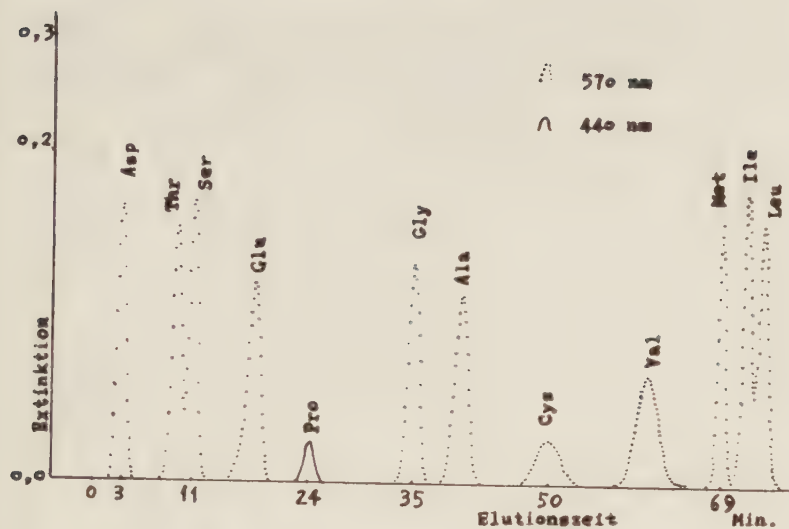


Abb.6. Chromatogramm eines Aminosäure-Gemisches, je $0,1 \mu\text{M}$, bei der Gesamtaminosäureanalyse mit dem Analysator Multichrom B (Beckman 42551)

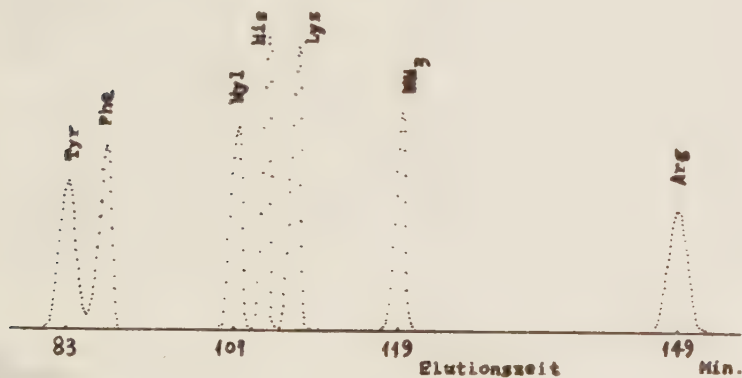


Tabelle 2. Gesamtaminosäureanalyse des Kollagen- und Gelatinepräparates G 7.

Aminosäure	Elutions- zeit (Min.)	Kollagen G 7		Gelatine G 7	
		Zeit (Min.)	Reste/1000	Zeit (Min.)	Reste/1000
Hyp	0	0	87,1	0	93,3
Asp	3	3	45,0	3	44,1
Thr	9	9	18,0	10	16,1
Ser	11	11	33,9	12	29,9
Glu	18	18	68,8	19	66,7
Pro	24	24	131,3	26	142,1
Gly	35	36	333,5	39	339,1
Ala	40	41	113,8	44	118,4
Cys	50	--	--	--	--
Val	61	61	21,0	65	21,5
Met	69	68	10,3	67	5,3
Ile	72	71	14,9	70	11,9
Leu	74	73	29,1	72	23,9
Tyr	83	--	-- *	82	1,2
Phe	87	86	9,2	85	8,5
Hyl	101	100	7,1	98	7,5
His	104	103	3,5	102	4,7
Lys	108	107	25,6	105	23,3
NH ₃	119	118	--	117	--
Arg	149	148	48,0	146	42,6
			1000,1		1000,1

* Unterhalb der Nachweisgrenze

Tabelle 3. Verschiedene Gruppen der Aminosäuren.

Gruppe	Aminosäure	Kollagen G 7	Gelatine G 7
Sauere Reste	Asp	45,0	44,1
	Glu	<u>68,8</u>	<u>66,7</u>
		113,8	110,8
Basische Reste	Arg	48,0	42,6
	His	3,5	4,7
	Lys	25,6	23,3
	Hyl	<u>7,1</u>	<u>7,5</u>
		84,2	78,1
Unpolare Reste	Ala	113,8	118,4
	Phe	9,2	8,5
	Leu	29,1	23,9
	Ile	14,9	11,9
	Val	21,0	21,5
	Met	10,3	5,3
	Pro	<u>131,3</u>	<u>142,1</u>
		329,6	331,6
Hydroxy- Reste	Ser	33,9	29,9
	Thr	18,0	16,1
	Tyr	--	1,2
	Hyp	87,1	93,3
	Hyl	<u>7,1</u>	<u>7,5</u>
		146,1	148,0
Iminosäuren	Pro	131,3	142,1
	Hyp	<u>87,1</u>	<u>93,3</u>
		218,4	235,4

Tabellen 2, 3 und 4 zeigen die Ergebnisse der Aminosäureanalyse der Präparate und bestätigen gleichzeitig die in der Literatur (3, 60) angegebenen Resultate, nämlich,

- (a) Der Glycingehalt betrug ungefähr 33% der Gesamtaminosäurereste.
- (b) Hydroxyprolin und Hydroxylysin waren vorhanden.
- (c) Die Gehalte von Tyrosin und Methionin waren niedrig.
- (d) Es fehlte Cystin.
- (e) Die Aminosäurereste, Glycin, Prolin, Hydroxyprolin und Alanin bildeten zwei Drittel der Gesamtaminosäurereste.

Folglich war die Gesamtaminosäureanalyse die sicherste Methode der Identifizierung von Kollagen. Tabelle 5 zeigt, daß Gelatine generell einen größeren Anteil an Iminosäuren enthält als Kollagen.

Tabelle 4. Zwei Drittel der Gesamtaminosäurereste (666,7/1000)

Aminosäure	Kollagen G 7	Gelatine G 7
Gly	333,5	339,1
Pro	131,3	142,1
Hyp	87,1	93,3
Ala	<u>113,8</u>	<u>118,4</u>
	665,7	692,9

Tabelle 5. Anteil an Iminosäuren im Kollagen und Gelatine

Ausgangsmaterial	Anteil an Iminosäuren in Resten/1000		Literatur
	Kollagen	Gelatine	
Kalbshaut	218,4	235,4	Präparate G 7
Lungenfischhaut	203,8	220,4	43
Rinderhaut	212,0	217,0	44,45
Rinderknochen	220,0	217,0	44
Hühnerknochen	226,0	229,0	44

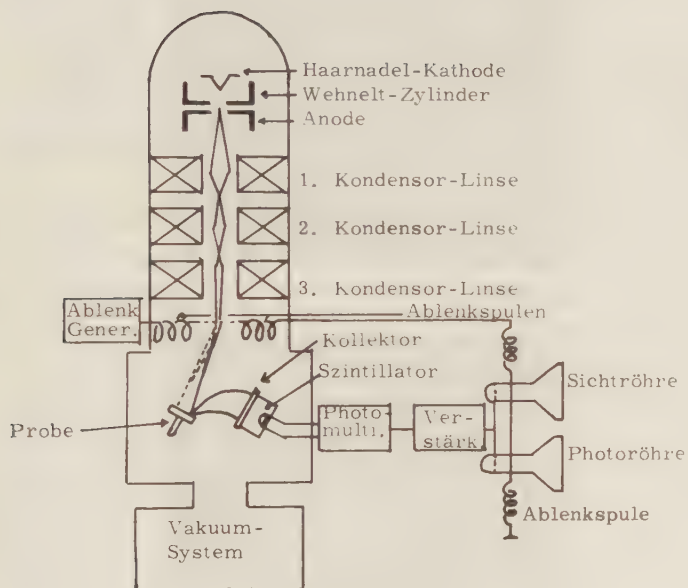


Abb. 7 Rasterelektronenmikroskop (61)

4.3. Rasterelektronenmikroskopie

Im Jahr 1965 brachte Cambridge Scientific Instruments Ltd. das erste Rasterelektronenmikroskop in den Handel. Die erreichte Auflösung war $250 \text{ \AA}$. Abb. 7 zeigt den schematischen Aufbau eines Rasterelektronenmikroskopes. Die Elektronenquelle besteht in üblicher Weise aus einer stark erhitzten, haarnadelförmigen Wolframdraht-Kathode, einem Zylinder und der Anode. Aus dieser Quelle tritt ein divergentes Bündel von Elektronen heraus. Magnetische Linsen (Kondensorlinsen) sorgen dafür, daß die Elektronen immer feiner gebündelt werden. Die letzte Linse fokussiert den Elektronenstrahl auf die Probe (61).

Dieser Elektronenfleck wird zeilenweise über das Präparat bewegt. Dies geschieht mittels Magnetspulen, die in zwei aufeinander senkrecht stehenden Richtungen angeordnet sind. Die zur Ablenkung erforderlichen Ströme liefert der Ablenkgenerator. Damit die erforderliche starre Kopplung zwischen abtastendem Strahl und aufzeichnendem Strahl gewährleistet ist, durchfließen diese Ströme auch Ablenkspulen, die sich bei den Fernsehbirnen befinden und den Leuchtpunkt auf dem Bildschirm in gleicher Weise bewegen wie den Elektronenstrahl auf der Probe. Den Vergrößerungsmaßstab der Abbildung bestimmt die Länge der Rasterkanten auf der Probe. Je kleiner das abgerasterte Feld, desto höher die Vergrößerung. Die von der Probe reemittierten Elektronen gelangen in einen Detektor, der aus einem Kollektor, einem Szintillator, einem Lichtleiter und einem Photomultiplier besteht. Der Detektor liefert eine elektrische Spannung, die der Menge der von der Probe reemittierten Elektronen proportional ist. Nach entsprechender Verstärkung dient diese Spannung dazu, die Helligkeit der Leuchtpunkte auf dem Fernsehbildschirm zu steuern. In der vorliegenden Arbeit wurde das Rasterelektronenmikroskop, Stereoscan Mark IIa^{*}, angewandt.

^{*} Ich danke Herrn Prof. R. Herbst und Frau A. -M. Multier für die freundliche Bereitstellung des obengenannten Gerätes.

Abb. 8a

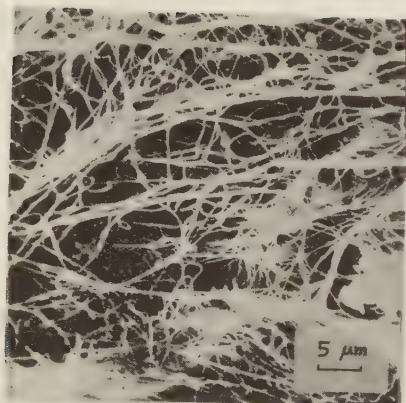


Abb. 8b

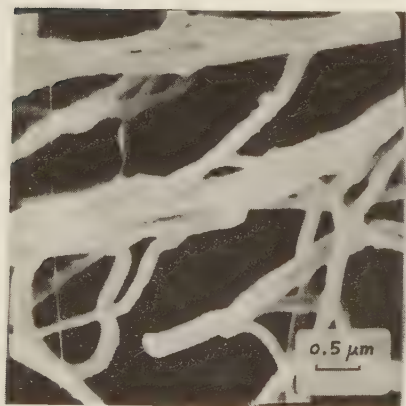


Abb. 8. Rasterelektronenbilder eines gefriergetrockneten Kollagenpräparates der Achillessehne. Auf den Bildern erkennt man das Kollagen in Form von feinen Fibrillen.

Abb. 9a

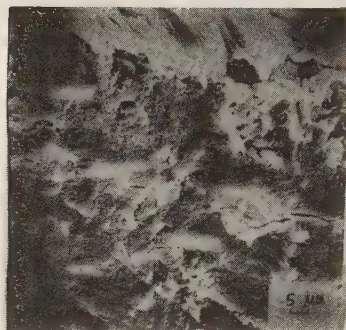


Abb. 9b

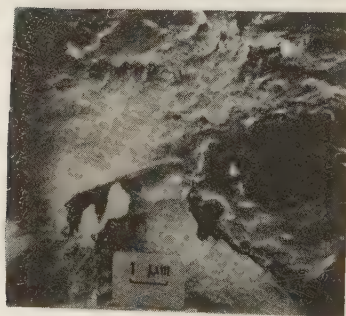


Abb. 9. Rasterelektronenbilder der geschnittenen Zone der Rattenschwanzsehne.

Die ersten eingesetzten Kollagenpräparate waren die Achilles- und Rattenschwanzsehne. Sie enthielten natives Kollagen. Abb. 8 besteht aus zwei Rasterelektronenbildern eines gefriergetrockneten Kollagenpräparates der Achillessehne (Kollagen Z). Auf den Bildern erkennt man das Kollagen in Form von feinen Fibrillen. Abb. 9 zeigt die geschnittene Zone einer Rattenschwanzsehne. Die Gruben auf Bild (b) entsprechen vermutlich einer Gitterstörung (14) in der Rattenschwanzsehne. Oben auf der Abb. 9a erkennt man einige Erhöhungen auf der Oberfläche der Sehne. Es handelt sich um ein unterliegendes geordnetes Kollagennetzwerk, wie Holmes und Fyfe (31) in ihren Untersuchungen mit Sehnen gezeigt haben.

Die obenerwähnte Untersuchung geschah mit nativem Kollagen, aber die Erforschung lösliches Kollagens mit dem Rasterelektronenmikroskop ist noch nicht beschrieben worden; sie wird im folgenden ausführlich dargestellt.

In dieser Arbeit wurden 10 gefriergetrocknete Kollagenpräparate mit Gold bedampft und im Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Obwohl die Isolierungsmethoden dieser Präparate unterschiedlich sind, bestehen noch manche Ähnlichkeiten. Das Ausgangsmaterial war die Haut von Kalbembryo. Sie wurde durch einen Fleischwolf zerrieben und mit einer NaCl-Lösung extrahiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Rückstand mit Essigsäure oder Natriumcitratpuffer extrahiert und zentrifugiert. Nach Zugabe von NaCl zu einer Endkonzentration von 7 Gew.% wurde das Kollagen ausgefällt. Das Kollagen wurde wie oben beschrieben umgefällt und anschließend wieder in einer Essigsäurelösung gelöst. Es folgten die Dialyse gegen destilliertes Wasser und das Gefriertrocknen des Kollagenpräparates. Stellt " A " die weitere Behandlung des Kollagens vor der Dialyse, " B " die weitere Behandlung des Kollagens vor dem Gefriertrocknen und " C " die Beobachtung im Rasterelektronenmikroskop dar, zeigen sich folgende interessante Ergebnisse:

Kollagenpräparat Nummer 1 (d.i. Präparat J₁d., s.S. 13 und Abb.10):

A. Das Extraktionsmittel war eine 0,1 M Natriumcitratpufferlösung mit pH 3,7. Vor der Dialyse wurde kein NaCl zur Kollagenlösung hinzugefügt.

B. Die Kollagenlösung wurde einige Tage lang gegen destilliertes Wasser dialysiert, und das gefällte Kollagen wurde nach Zentrifugieren gewonnen.

C. Die Dicke einer betrachteten Fibrille beträgt 0,46 μm . Man erkennt viele feine Kollagenfibrillen, die wie native Kollagenfibrillen aussehen (19), denn für das Kollagen waren bei der Dialyse ausreichend Zeit und eine niedrige Konzentration des Kollagens vorhanden.

Kollagenpräparat Nr. 2 (d.i. Präparat J₁f.t., s.S. 13 und Abb.11):

A. Als Extraktionsmittel diente eine 0,1 M Natriumcitratpufferlösung mit pH 3,7. Vor der Dialyse wurde NaCl zur Lösung hinzugefügt, und das gefällte Kollagen wurde von der Lösung getrennt.

B. Das Kollagen wurde durch eintägige Dialyse behandelt. Vor der Gefriertrocknung war das Kollagen in einem halblöslichen Zustand.

C. Die Dicke einer betrachteten Fibrille beträgt 1,5 μm . Die Oberfläche des Kollagens ist rauh. Da eine zu hohe Konzentration des Kollagens und nicht genügend Zeit bei der Dialyse vorhanden waren, wurden keine sehr feinen Fibrillen gebildet.

Kollagenpräparat Nr. 3 (Abb. 12a und b):

A. Als Extraktionsmittel diente eine 0,5 M NaCl-Lösung mit pH 7,4. Das hergestellte Kollagen wurde in eine Lösung mit 0,5% Phenonip und 2,5% Tween 80 gebracht.

B. Das Kollagen wurde gegen destilliertes Wasser dialysiert.

C. Die Dicke einer betrachteten Fibrille beträgt 7 μm . Das Kollagen, das noch Konservierungsmittel enthält, besitzt eine glänzende Oberfläche.

Kollagenpräparat Nr. 4 (Präparat J₂, s.S.13 und Abb. 13) :

A. Das Extraktionsmittel war eine 0,1 M Natriumcitratpufferlösung mit pH 3,7. Vor der Dialyse wurde NaCl zur Kollagenlösung gegeben.

B. Ohne Dialyse wurde das gefällte Kollagen gefriergetrocknet. Es entstanden dadurch nicht nur trockene NaCl-Partikeln und dicke Faserbündel, sondern auch Kollagenfibrillen. Diese Fibrillen wurden zusammen mit den NaCl-Partikeln durch ein Sieb vom Typ 0,8 DIN 4188 ausgeschüttelt, ohne die dicken Bündel durchgehen zu lassen.

C. Man erkennt eine Fibrille mit Dicke 1,7 μm . Sie ist durch das Sieb gekommen. Ohne die Rasterelektronenmikroskopie würde die Anwesenheit dieser Fibrille kaum festzustellen sein. Infolgedessen zeigt dieser Versuch ein Beispiel für die Anwendung der Rasterelektronenmikroskopie bei der Identifizierung von Kollagen.

Kollagenpräparat Nr. 5 (Präparat G 7, s.S.13 und Abb. 14) :

A. Als Extraktionsmittel diente eine 0,1 M Essigsäurelösung. NaCl wurde bis zu einer Konzentration von 7 Gew.% hinzugefügt. Durch das Zentrifugieren wurde das Kollagen in 2 Fraktionen aufgetrennt. Die obere Schicht, die leichter als die 7%ige NaCl-Lösung war, wurde gereinigt und in eine Lösung mit 0,3% Phenonip, 0,1% Tween 80 und 0,1% Propandiol-1,3 gebracht. Der untere Teil war Kollagenpräparat Nr. 6.

B. Nach 2-wöchiger Dialyse gegen destilliertes Wasser wurde das Kollagen gefriergetrocknet.

C. Im Rasterelektronenmikroskop erkennt man ein Netzwerk feiner Kollagenfibrillen. Die Dicke einer beobachteten Fibrille beträgt 0,17 μm . Auf dem Bild 14(b) befindet sich eine Fibrille, die aus 3 feineren gebündelten Fibrillen besteht. Mehrere zusammengelagerte Fibrillen bilden sich zu einer Schicht aus.

Kollagenpräparat Nr. 6 (Präparat G 8) :

A. Dieser Teil des Kollagens besaß eine größere Dichte als die 7%ige NaCl-Lösung. Nach der Reinigung wurde das Kollagen in eine Lösung

mit 0,3% Phenonip, 0,09% Tween 80 und 0,09% Propylenglycol gebracht.

B. Nach 2-wöchiger Dialyse gegen destilliertes Wasser wurde das Kollagen gefriergetrocknet.

C. Die Dicke einer beobachteten Fibrille beträgt 0,23 μm . Diese Fibrille hat sich an der Kollagen-Schicht angelagert. Im Präparat G 8 haben sich die Fibrillen stärker als im Präparat G 7 zusammengelagert. Daher ist Präparat G 8 schwerer als die 7%ige NaCl-Lösung. Nach der Gefrier Trocknung ist das Kollagenpräparat G 8 nicht mehr in 0,1 M Essigsäure löslich (s. Abb. 15).

Kollagenpräparat Nr. 7 (Präparat $K_3(K_2)$) :

A. Als Extraktionsmittel diente eine 0,1 M Essigsäurelösung. Die Kollagenlösung wurde mit NaCl versetzt.

B. Ohne Dialyse wurde das Kollagen gefriergetrocknet.

C. Die Dicke einer betrachteten Fibrille beträgt 9 μm (Abb. 16a). Auf der rauhen Kollagenoberfläche kann man NaCl-Kristalle erkennen.

Kollagenpräparat Nr. 8 (s.S. 70):

A. Die Behandlung zur Herstellung der Kollagenlösung war die gleiche wie bei Nummer 6A. Außerdem wurde NaCl zur Kollagenlösung hinzugegeben.

B. Ohne Dialyse wurde das Kollagen mit Aceton gewaschen.

C. Die Dicke einer betrachteten Fibrille beträgt 3,6 μm ; NaCl-Kristalle sind noch zu sehen. Das Aceton hat nur die NaCl-Kristalle entfernt, die direkt auf den Fibrillen hafteten, und nicht die Kristalle aus den Zwischenräumen. Dieser Befund spielt eine wichtige Rolle in der Erklärung folgender Untersuchungsergebnisse: Mehrere Stücke dieses gefriergetrockneten Präparats wurden gewogen und hydrolysiert. Die Bestimmungen des Hydroxyprolinegehalts der Hydrolysate wurden anschließend durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß der Hydroxyprolinegehalt der Hydrolysate unterschiedlich war, weil die gewogenen Stücke unterschiedliche NaCl-Mengen enthielten. Dieser

Abb. 10 - 19. Raster-
elektronenbilder der löslichen
Kollagenpräparate, die auf
verschiedene Weisen, beispiels-
weise mit Lauge, behandelt
wurden. Der Pfeil in einigen
Bildern zeigt die Stelle, wo die
Dicke der Fibrille berechnet
wurde. Eine ausführliche
Erklärung der Bilder ergibt
sich im Text.

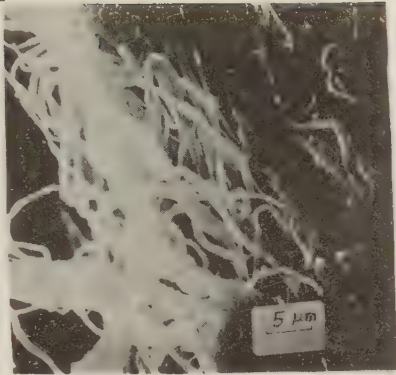


Abb. 10

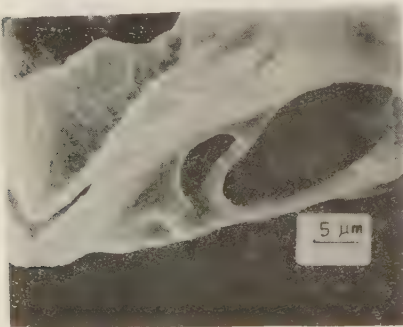


Abb. 11a

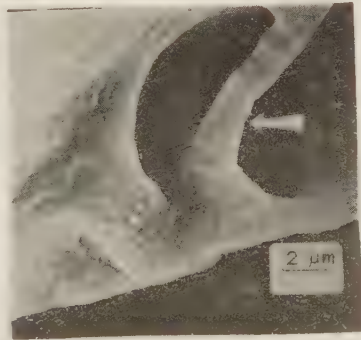


Abb. 11b

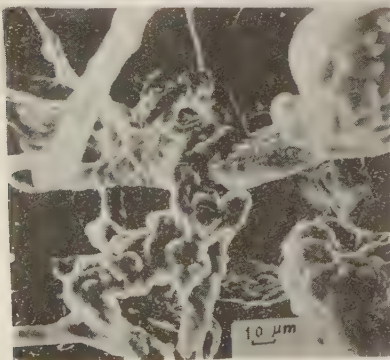


Abb. 12a

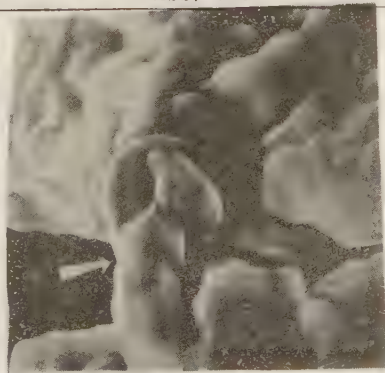


Abb. 12b

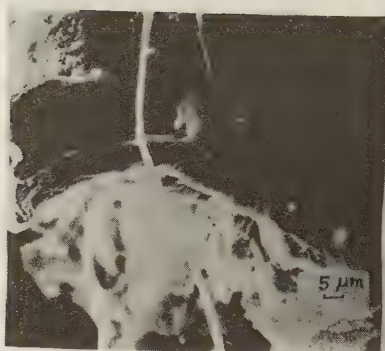


Abb. 13a

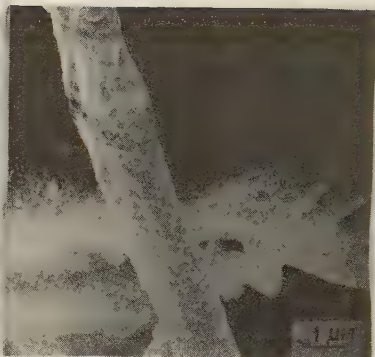


Abb. 13b

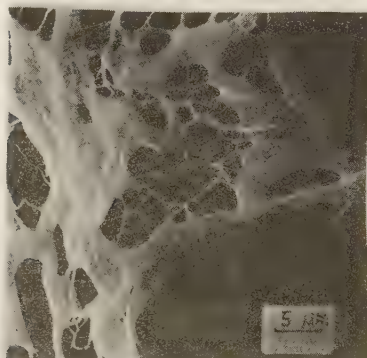


Abb. 14a

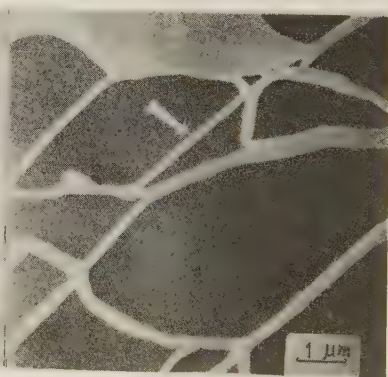


Abb. 14b

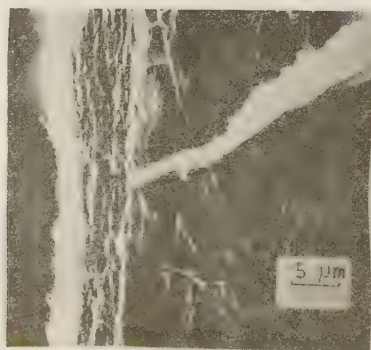


Abb. 15a

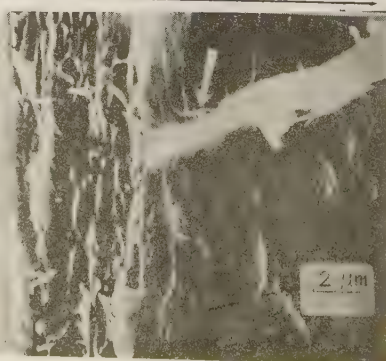


Abb. 15b

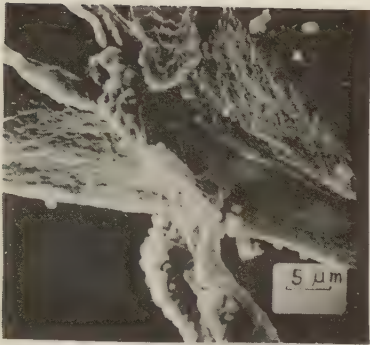


Abb. 16a

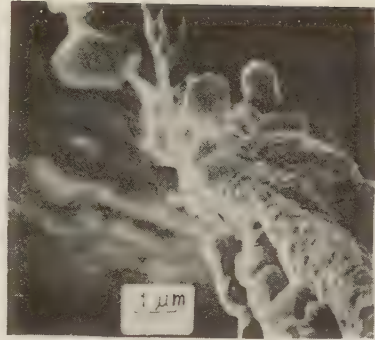


Abb. 16b

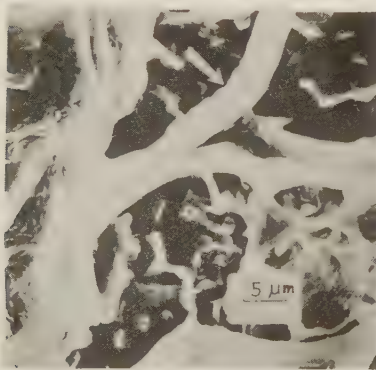


Abb. 17a



Abb. 17b

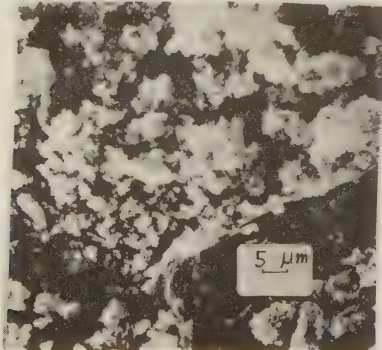


Abb. 18a

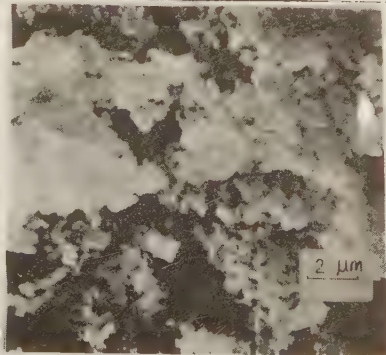


Abb. 18b

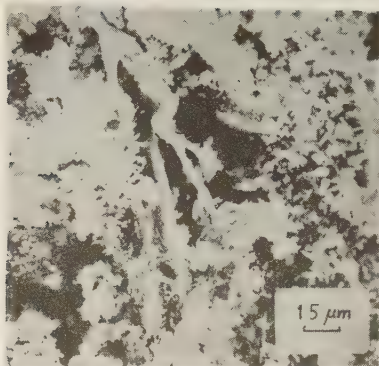


Abb. 18c

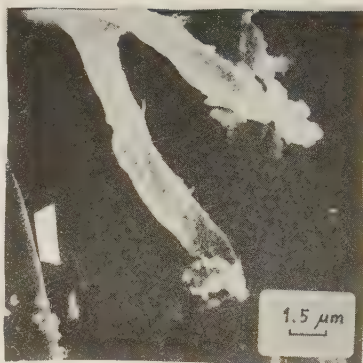


Abb. 18d

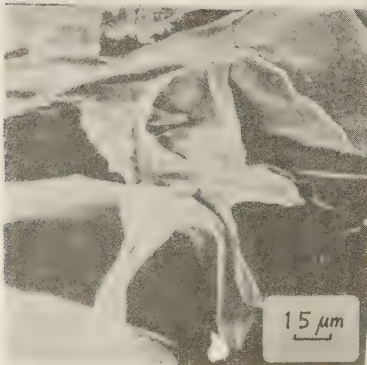


Abb. 19a

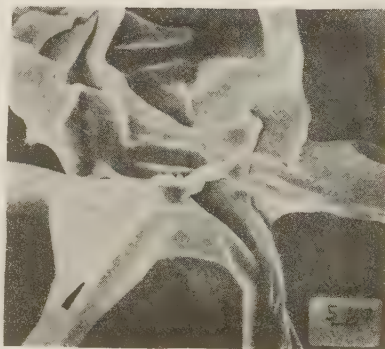


Abb. 19b

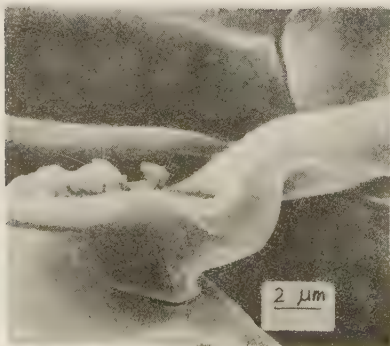


Abb. 19c

der Kollagenmoleküle erschwert.

Die in der Literatur noch nicht dargestellten Bilder sind z.B. (1.) das Bild mit der glänzenden Oberfläche (Abb. 12), (2.) das mit dem Aussehen eines Seiles (Abb. 13), (3.) das mit NaCl-Kristallen auf der rauhen Oberfläche (Abb. 16), (4.) das Bild, das die Dehydratation-Wirkung des Acetons auf einem Kollagenpräparat zeigt (Abb. 17), (5.) das mit dem Aussehen wie eine Anhäufung von Blumenkohl (Abb. 18), und (6.) das mit der relativ glatten Oberfläche der Gelatine (Abb. 19).

4.4. Infrarotspektroskopie

Die obenerwähnten Kollagenpräparate wurden durch die Anwendung der Infrarotspektroskopie weiter untersucht. Als Meßgerät diente der Infrarot-Spektrograph, Modell III G (E. Leitz, Wetzlar). Ein Kollagenpräparat (Nr. 2 auf S. 34, 4 mg) wurde mit 1 g. KBr (p.a. spektro.) gemischt und in Form einer Tablette gepreßt. Das IR-Spektrum zeigte folgende Banden:

Tabelle 6. Banden im IR-Spektrum eines Kollagenpräparates

Lage cm^{-1}	Bemerkungen
3260	N-H Streckschwingung, Amid-A-Bande. Die Bande wurde von der O-H Streckschwingung des Wassers überlagert (64).
3030	N-H Streckschwingung, Amid-B-Bande.
2900	C-H Streckschwingung.
1660 - 1630	Die Amid-I-Bande des sekundären Amids, (C=O Streck-schwingung), die Amid-I- und Amid-II-Banden des primären Amids und die HOH-Deformationsschwingung (69).
1540	Amid-II-Bande des sekundären Amids. Sie stellte die N-H Deformations- und die C-N Streckschwingung dar.
1448	C-H Deformationsschwingung.
1390	Symmetrische CH_3 -Deformationsschwingung.
1235	Amid-III Bande.
1075	C-O Streckschwingung.
620	N-H Deformationsschwingung, Amid-IV-Bande.

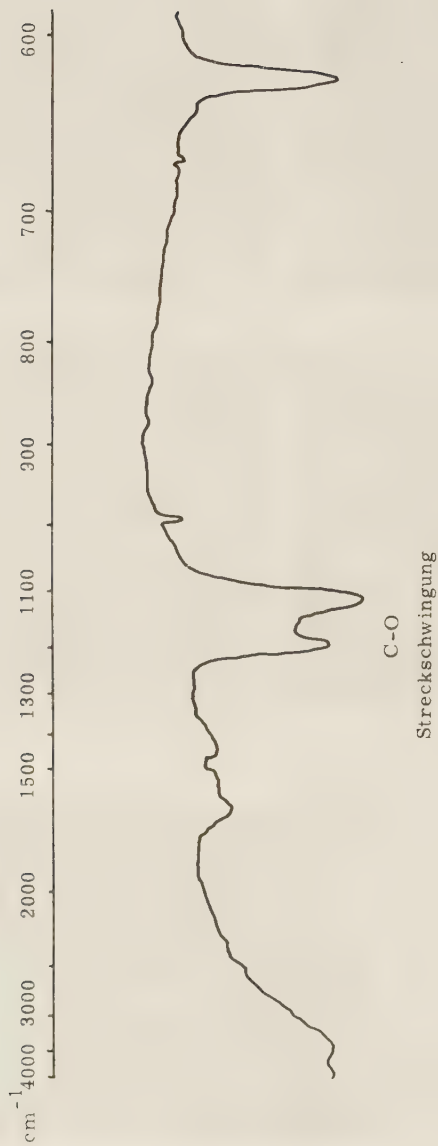


Abb. 20 Infrarot-Transmissionsspektrum des Kollagenpräparates, das 3 Tage lang mit einer 5-prozentigen Natronlauge behandelt wurde.



Abb. 21a. Infrarot-Transmissionspektrum des Gelatinepräparates G 7 mit KBr.

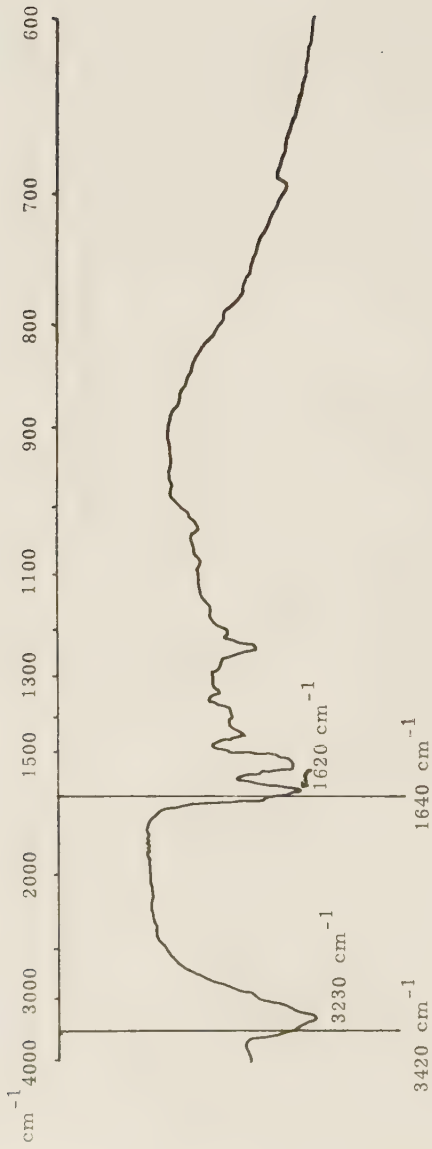


Abb. 21b. Infrarot-ATR-Spektrum des Gelatinepräparates G 7, Einfallswinkel = 45° .

30 andere IR-Spektren von verschiedenen Kollagenpräparaten wurden dargestellt, und die Ergebnisse ergaben sich wie folgt:

1. Die Bande für die Peptide-Bindung, -CO-NH- , sind die Amid-A, B, I, II, III und IV-Banden.
2. Die Amid-I-Bande ist generell stärker als die Amid-II-Bande.
3. Die Banden bei 2900, 2840, 1740 und 1110 cm^{-1} im Falle reines Kollagenpräparates sind im allgemeinen schwach oder nicht existent, so kann die Anwesenheit einer fremden Verbindung im Kollagenpräparat durch eine Auswertung des Infrarotspektrums erkannt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten fremden Verbindungen waren z.B. Phenonip und Tween 80, deren Spektren solche Banden zeigten, wie eine mittlere oder starke Bande bei 2900 cm^{-1} für die C-H Streckschwingung und eine mittlere oder starke Bande zwischen 1110 und 1000 cm^{-1} für die C-O Streckschwingung. Zur Entfernung dieser fremden Verbindungen wurde Aceton verwendet.
4. Das Kollagenpräparat, das 3 Tage lang mit einer 5-prozentigen Natronlauge behandelt worden war, wurde spektroskopisch weiter untersucht. Das IR-Spektrum stellte 2 starken Banden der C-O Streckschwingung bei 1190 und 1110 cm^{-1} dar, da zusätzliche Carboxylgruppen durch die intensive Behandlung mit Alkali frei wurden. Eine Kombination von zwei Verfahrensmethoden, nämlich Infrarotspektroskopie und Rasterelektronenmikroskopie, in der Erforschung von Kollagen war bis jetzt noch nicht in der Literatur dargestellt worden.

4.5. Die Methode der abgeschwächten Totalreflexion

Bei der fünften Identifizierungsmethode wurde die Leitz-Mikro-ATR-Einrichtung angewandt. Diese Methode der abgeschwächten Totalreflexion (IR-ATR) wurde erstmals von Fahrenfort beschrieben (18).

An der Grenzfläche zwischen Probenenträger der Mikro-Einrichtung und Probe erfolgt die durch das Absorptionsverhalten der Probe beeinflusste Totalreflexion, die von den Brechungsindizes der Grenzschichtmedien sowie von dem Einfallswinkel des Strahlenbündels abhängt.

Um eine Anpassung an sehr unterschiedliche Proben (mit verschiedenen Brechungsindizes) zu ermöglichen, ist der Einfallswinkel der Einrichtung zwischen 30° und 60° einstellbar. Außerdem können zur Variation des Brechungsindexes wahlweise Halbzylinder aus KRS-5 oder Germanium verwendet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Halbzylinder aus KRS-5 verwendet. Es wurde festgestellt, daß die Bande der Wasserabsorption bei 3420 cm^{-1} nicht auf der Amid-A-Bande des Kollagenpräparats 3230 cm^{-1} lag. Ähnlich wurde die Bande bei 1620 cm^{-1} nicht von der Bande der Wasser-Deformationsschwingung bei 1640 cm^{-1} gestört. Das war der Vorteil der ATR-Technik gegenüber den üblichen Verfahren der reinen Transmissionsmessung. Bei der Messung war die Verwendung von KBr nicht erforderlich, und das war ein weiterer Vorteil dieser Technik, da KBr Spuren von fremden Bestandteilen enthalten könnte.

4.6. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Noch eine Methode der Identifizierung des Kollagens war die Anwendung der Transmissions-Elektronenmikroskopie, die nicht durch die Einführung der Rasterelektronenmikroskopie ersetzt werden konnte, weil das ersterwähnte Verfahren eine höhere maximale Vergrößerung besitzt (Tabelle 7). Beobachtet man eine Kollagenfaser im Transmissions-Elektronenmikroskop, erkennt man deutlich den Aufbau der Fibrillen. Die Bausteine einer Fibrille sind die Kollagenmoleküle. Sie haben die Form eines steifen Stäbchens mit einer Länge von $2800\text{ \AA}$ und einem Durchmesser von $14\text{ \AA}$ (37).

Tabelle 7. Vergleich verschiedener Mikroskope (61)

Mikroskop-Typ	Auflösung	Maximale Vergrößerung
Lichtmikroskop	$2000 - 3000\text{ \AA}$	700 - 1000fach
Rasterelektronenmikroskop	$50 - 200\text{ \AA}$	10000 - 40000fach
Transmissions-Elektronenmikroskop	$1,5 - 10\text{ \AA}$	700000 - 3500000fach
Transmissions-Raster-elektronenmikroskop	$3 - 10\text{ \AA}$	200000 - 700000fach

4.7. Röntgenbeugungsstrukturanalyse

Der Durchmesser eines Kollagenmoleküls konnte auch durch eine sorgfältige Analyse der Röntgeninterferenzen ermittelt werden, da der maximale Äquatorreflex auf einem Kleinwinkelröntgendiagramm von Kollagen den Abstand zwischen benachbarten Protofibrillen darstellte. Der Reflex entsprach dem Abstand im physikalischen Raum von $10,6 \text{ \AA}$ für eine trockene Kollagenfaser und bis zu $17 \text{ \AA}$ im Falle einer feuchten Kollagenfaser (45).

Als Untersuchungsmaterial dienten Kollagenfasern, die aus Schwanzsehnen weißer Wistar-Ratten präpariert waren. Kleinwinkeldiagramme wurden mit der Kiessig-Kammer bei 200 mm Filmabstand im Vakuum bei Verwendung punktförmig ausgeblendeter CuK_{α} -Strahlung angefertigt. Die trockenen Fasern wurden vor den Röntgenstrahl gebracht. Die Photometerkurven wurden mit dem Joyce-Doppelstrahl-Mikrodensitometer unter Verwendung eines Laserstrahls angefertigt.

Abbildungen 23 - 25 sind Photometerkurven aus einem Kleinwinkeldiagramm. Stellt x den Abstand zwischen einem Reflex und dem Mittelpunkt des Beugungsdiagramms dar, A den Filmabstand von der Kollagenfaser, λ die Wellenlänge der CuK_{α} -Linie und d den Teilchendurchmesser der Kollagenfaser, gilt die folgende Gleichung:

$$d = \frac{A \lambda}{x}$$

Tabelle 8. d -Werte der Meridianreflexe von Abb.23

Nummer	$x \text{ mm}$	$d \text{ (}\text{\AA}\text{)}$
0	1,5	205,3
1	2,9	106,2
2	4,3	71,5
3	5,3	58,1
4	9,8	31,4

Ähnlich wurde der d-Wert für den Äquatorreflex Y auf Abb. 24 folgendermaßen ermittelt:

$$\frac{200 \times 1,54}{29} = 10,62 \text{ \AA}$$

Dieser Wert stellt den Durchmesser einer Protofibrille der trockenen Rattenschwanzsehne dar und steht in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Lüscher et al. (41). Sie haben bei Untersuchungen mit einem citratpufferlöslichen Kollagenpräparat einen d-Wert von 10,6 Å ermittelt, und das Präparat enthielt 60 mg H₂O/g.Prot. Mit zunehmendem Wassergehalt (300 mg H₂O/g.Prot.) stieg der d-Wert auf 12 Å.

Abb. 25 zeigt die Photometerkurve an dem Äquatorreflex von 10,6 Å. Mit dieser Kurve wurde ein Winkel von 5° rechnerisch ermittelt, und dadurch ist die Äquator-Aufspaltung bestätigt worden, die Nemetschek und Hosemann (45) zu dem Gedanken des Kink-Modells des nativen Kollagens veranlaßt hatte. Die Aufspaltungen um den Äquator entsprechen Reflexen höherer Schichtlinien, d.h. es wird eine Gitterzelle angenommen, deren c-Achse in Faserrichtung verläuft, und die eine bestimmte Struktur -- z.B. eine übergeordnete Helixstruktur bei Miller und Parry (44) -- besitzt.

Nicht nur die Röntgenkleinwinkelstreuung kann zur Identifizierung des Kollagens verwendet werden, sondern auch die Weitwinkelstreuung, wobei ein typisches Weitwinkelröntgendiagramm des Kollagens einen Meridianreflex von 3 Å und einen Äquatorreflex von ungefähr 12 Å darstellt (3).



Abb. 22. Röntgenbeugungsdiagramm einer verstreckten
nativ trockenen Kollagenfaser aus Rattenschwanzsehne.
Abstand Präparat-Film 200 mm, CuK_{α} -Strahlung.

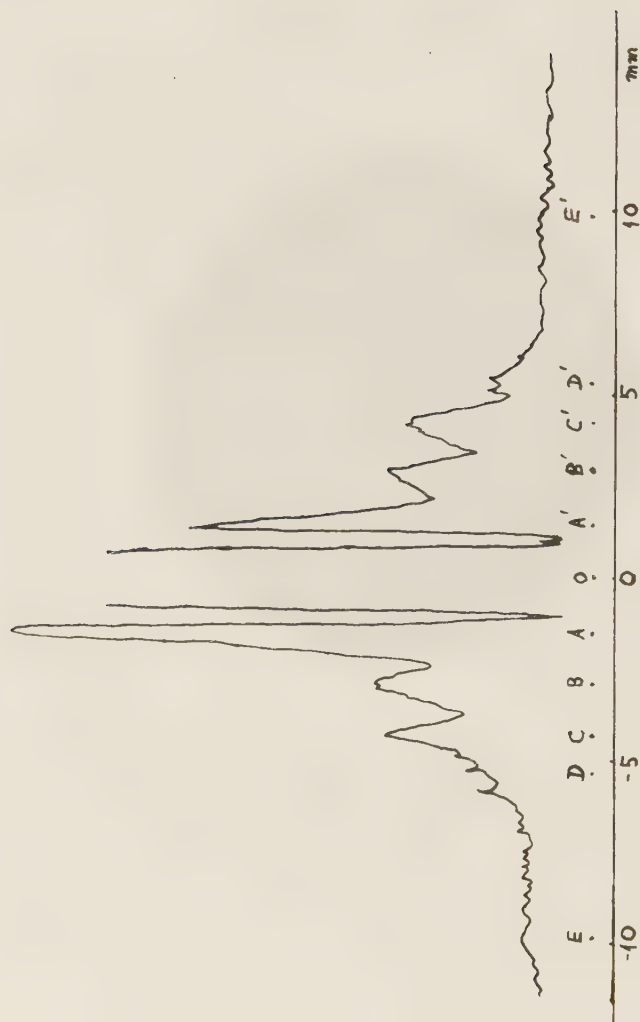


Abb. 23. Photometerkurve des Röntgenbeugungsdiagramms längs der Meridianreflexe.

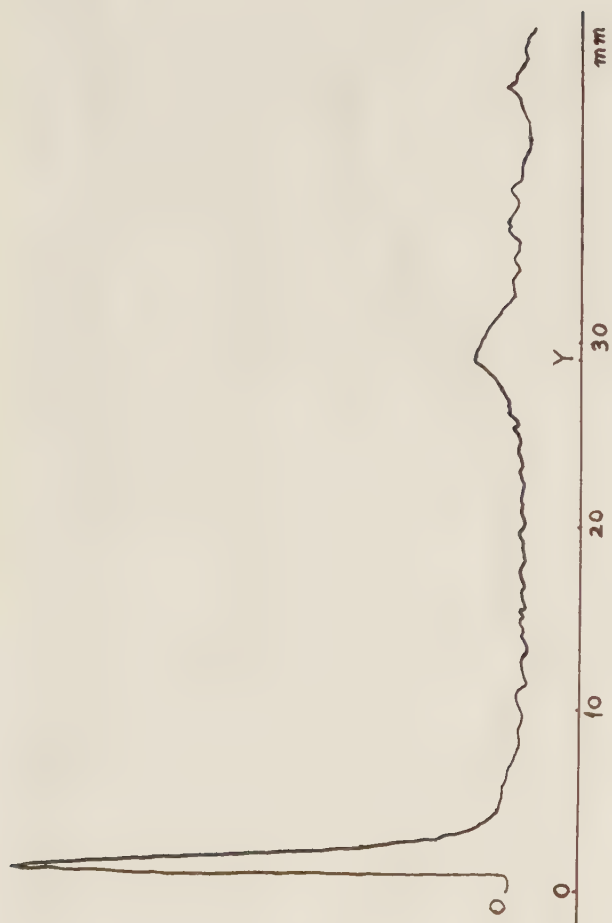


Abb. 24. Photometerkurve des Röntgenbeugungsdiagramms längs der Äquatorreflexe.

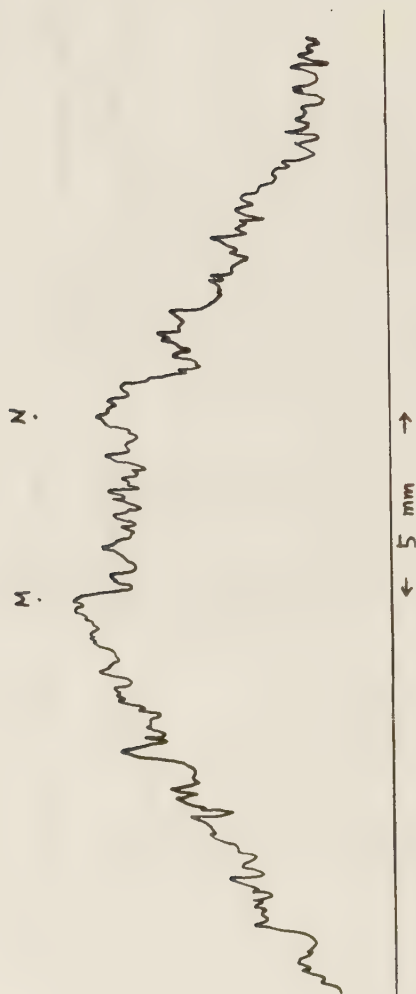


Abb. 25. Photometerkurve des Röntgenbeugungsdiagramms an einem Äquatorreflex zur Bestimmung der Aufspaltung dieses Reflexes.

5. EIGENSCHAFTEN DES KOLLAGENS:

Bei der Identifizierung von Kollagenen sind Eigenschaften des Kollagens, z.B. Stickstoff- und Hydroxyprolinegehalt, dargestellt worden. Die Eigenschaften werden noch weiter durch Methoden, wie Disk-Elektrophorese, Ultrazentrifugieren, Carboxymethylcellulose-Säulenchromatographie und Gefriertrocknung demonstriert.

5.1. Denaturierung

Eine wichtige Eigenschaft des Kollagens ist Denaturierung. Unter denaturiertem Kollagen versteht man, daß das Kollagen durch verdünnte Säuren, Alkalien, Alkohol, Aceton, Harnstoff, oberflächenaktive Stoffe, Erhitzung oder Bestrahlung gegenüber seinem ursprünglichen Verhalten sich irgendwie verändert (40, 62). Kollagen besitzt wie alle Proteine seine native Struktur nur innerhalb eines bestimmten Bereiches von äußeren Bedingungen. Wenn einer der Parameter, die seine Stabilität beeinflussen -- z.B. die Temperatur -- einen bestimmten Wert überschreitet, so tritt ein Zusammenbruch der Tripelhelix ein. Diese Umwandlung ist durch den kooperativen Effekt im Helix-Knäuel-Übergang -- die Stabilität jedes Bereiches hängt von der Stabilität der Nachbarbereiche ab -- sehr scharf und fast mit dem Schmelzen eines Kristallgitters vergleichbar.

Die Denaturierung des Kollagens im festen Zustand nennt man Schrumpfung (66, 67). Ein Schrumpfungsexperiment wurde zur Feststellung des Zusammenhangs zwischen der Länge des Rattenschwanzes und der Schrumpfungstemperatur durchgeführt. Rattenschwanzsehnen (aus verschiedenen Rattenschwänzen) einer bestimmten Länge (10 cm) wurden in Wasser an dem einen Ende befestigt und an dem anderen Ende mit Gewichten beladen. Die Temperatur des Wassers wurde langsam erhöht. Bei gewissen Temperaturen schrumpften die Sehnen. Durch Belastung der Sehnen mit Gewichten zerreißen diese zum Zeitpunkt der Schrumpfung. Die Temperaturen wurden auf einer Tabelle (Tab. 9) eingetragen. Nach 7 Versuchen stellte ich fest, daß die Länge des Rattenschwanzes ab ca. 11 cm

Tabelle 9. Die Schrumpfungstemperatur lag zwischen 50° und 66°C.

Länge des Rattenschwanzes (cm)	Rattenschwanzsehne	
	Gewicht (mg.)	Schrumpfungstemperatur (°C) (Sehnen wurden zerrissen)
20,5	2,25	55
	1,9	53
19,0	2,4	51
	2,3	50
	1,88	53
18,7	2,11	50
	2,66	53
	2,49	50
17,3	1,85	53
	1,9	52
	2,01	50
15,5	2,3	62
	2,59	66
	1,28	56
15,2	1,79	58
	2,5	61
	1,9	58
11,5	2,2	50
	2,7	50

keine genaue Aussage über die Schrumpfungstemperatur vermittelt. Lediglich lag sie zwischen 50°C und 66°C.

Obwohl die oben dargestellte Reißfestigkeitsprüfung an Rattenschwanzsehnen einfach ist, ist sie für die Forschung des Alterns eine häufig angewandte Methode (4, 17, 30). Bei der Methode ist die Reißfestigkeit abhängig vom Anteil des neutralsalzlöslichen wenig quervernetzten Kollagens. Die Ergebnisse bei der Untersuchung des Einflusses des Heparins auf den Kollagenstoffwechsel von Hähnel (25) zeigen die Zunahme der Quervernetzungen der Kollagenfibrillen im Alternungsprozeß. Die Wirkungsweise des Heparins auf das Rattenschwanzkollagen scheint erstens vom Alter der Tiere und zweitens von der Dosierung abhängig zu sein. Da die Kollagenreifung vom Absinken

des Gehaltes an sauren Mukopolysacchariden abhängig ist, sollen dagegen hohe Dosen Heparin eine Reifungsstörung hervorrufen. Es ist bekannt, daß saure Mukopolysaccharide die Hydratationshülle der gealterten Kollagenfibrillen erweitern. Durch Komplexbildung anionischer Mukopolysaccharide mit Kollagen wird eine Zerstörung der Tripel-Helix-Struktur angenommen. Dadurch können sich die Fibrillen im Reißtest wie die jüngerer Tiere verhalten, d.h., sie reißen früher als bei den Kontrollen ohne Dosierung.

5.2. Löslichkeit

Die zweite Eigenschaft des Kollagens bezieht sich auf seine Löslichkeit. Es wurde festgestellt, daß ein kleiner Teil des Kollagens mit Neutralsalzlösungen und ein meist etwas größerer bei anschließender Extraktion mit sauren Puffern oder sehr verdünnten Säuren gelöst wird. Das auf die erstgenannte Art extrahierbare Kollagen muß im ursprünglichen Gewebe in schon löslicher Form vorliegen, denn die Salzlösungen, mit denen man es herauslöst, unterscheiden sich in Bezug auf pH-Wert und Ionenstärke nicht wesentlich von der Gewebsflüssigkeit selbst. Die Struktur der zurückbleibenden Kollagenfasern bleibt unzerstört. Beim neutralsalzlöslichen Kollagen handelt es sich um eine echte Vorstufe (11) des reifen Kollagens, während sich dieses für das säurelösliche Kollagen nicht bestätigt hat. In löslichen Kollagenen handelt es sich im wesentlichen um Monomere des Kollagens, aus welchen das unlösliche, reife Kollagen unter Bildung von intermolekularen Quervernetzungen aufgebaut ist.

Es wurde gefunden, daß das neutralsalzlösliche Kollagen nach der Extraktion nicht wieder in Neutralsalzlösungen löslich ist, es ist nur in Säuren wieder löslich. Zwei Kollagenpräparate, die längere Zeit in einer 0,1 M Essigsäurelösung mit Tween 80, Phenonip und Vitamin C aufbewahrt wurden, waren nach anschließender Dialyse und Lyophilisation nicht mehr in 0,1 M Essigsäurelösung löslich. In sauren Lösungen verfügen die Kollagenmoleküle infolge der undissoziierten Carboxylgruppen nur über positiv geladene Ammonium-

und Guanidinium-Ionen. Die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den positiven Gruppen erhalten die Löslichkeit der Moleküle. Die Fibrillen des Kollagens bilden sich bei Dialyse gegen Leitungswasser. Durch die pH-Erhöhung dissoziieren die Carboxylgruppen, die neugebildeten negativen Ladungen reagieren mit den positiven Ladungen anderer Kollagenmoleküle, und es kommt zur Aggregation. Da dieser Vorgang bei einer Dialyse sehr langsam vor sich geht, haben die Moleküle Gelegenheit, sich hochgeordnet zusammenzulagern. Bei den zwei obenerwähnten Kollagenpräparaten war die Zusammenlagerung zu groß, so daß die Lösbarkeit im gleichen Lösungsmittel nicht mehr realisiert werden konnte.

5.3. Komponenten

Es gibt drei Typen von Kollagenmonomeren (8), die nur im denaturierten Zustand unterscheidbar sind: Typ I besteht aus drei Einzelsträngen (die α -Komponente) ; Typ II aus einem Einzelstrang und zwei verbundenen Strängen (die α - und β -Komponenten); in Typ III sind alle drei Peptidstränge miteinander verbunden (die γ -Komponente). Das Verhältnis, in dem diese Molekültypen in einer bestimmten Kollagenart anwesend sind, läßt sich aus dem Verhältnis der Komponenten nach der Denaturierung berechnen. Demnach besteht neutralsalzlösliches Kollagen hauptsächlich aus Typ I neben etwa 10% aus Typ III. In sauren Extrakten aus Kalbshäuten wird das Molverhältnis $\alpha:\beta = 1:1$. Es besteht also hauptsächlich aus Typ II (wieder neben etwa 10% aus Typ III).

An Hand der obenerwähnten Erkenntnisse wurden einige Kollagenpräparate zur Untersuchung mit der Disk-Elektrophorese verwendet. Durch diese Methode konnten die neutralsalzlöslichen und säurelöslichen Kollagenpräparate unterschieden werden. Für den Versuch wurden drei Lösungen hergestellt:

Lösung A (100 ml) : 10 g. Acrylamid, 0,26 g. N,N'-Methylenbisacrylamid, 9 g. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,12 ml TMED (d.i. N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin), 12 ml 1 N HCl

und 10 ml 3% Tween 80.

Lösung B (100 ml): 0,1 g. Ammoniumperoxodisulfat

Lösung C (250 ml): 5,3 g. Acrylamid, 0,57 g. N,N'-Methylen-bisacrylamid, 1,6 g. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,19 ml TMED, 6,6 ml 1 M Phosphorsäure und 4,7 ml 3% Tween 80.

Die drei Lösungen wurden im Verhältnis von 1:1:1 vermischt und mit einer Pipette in 4 Röhrchen gefüllt. Aus der Lösung bildete sich das Trenngel durch Polymerisation. Vier hitzedenaturierte (bei 40°C) Kollagenpräparate, je 50 µg, wurden dann in die Röhrchen übertragen. Weiter wurden die Röhrchen in das Gestell der Disk-Elektrophorese-Einrichtung eingesetzt. Nach 5-stündiger Elektrophorese wurden die Gele mit Amidoschwarz gefärbt und nach einigen Stunden entfärbt. Die Komponenten jedes Kollagenpräparats konnten dabei von den Gelen gezeigt werden (Tabelle 10):

Tabelle 10. Nach der Disk-Elektrophorese wurden Komponenten der löslichen Kollagenpräparate von den Gelen gezeigt.

Kollagentyp	Kollagenpräparat	Komponenten
Neutralsalzlösliches Kollagen	Nr. 3 (vgl. S. 34)	eine
Säurelösliches Kollagen	Nr. 5 (vgl. S. 35)	zwei
Säurelösliches Kollagen	Nr. 6 (vgl. S. 36)	zwei
Säurelösliches Kollagen	A (vgl. S. 13)	zwei

Es liegt die Vorstellung nahe, daß, ausgehend von den Molekülen des Typs I, die, wie erwähnt, eine echte Vorstufe des reifen Kollagens darstellen, im Laufe der Biosynthese mit zunehmender Vernetzung Moleküle des Typs II und schließlich Moleküle des Typs III entstehen.

5.4. Sedimentationsdiagramm

Die obenerwähnte Disk-Elektrophorese benutzt man auch zur Reinheitsprüfung von Proteinen. Die Methode nutzt die elektrische Ladung aus, die alle Proteine haben. Art (positive und negative) und Größe der Ladung hängen dabei vom pH-Wert der Lösung ab. Auf Grund der Ladung wandern Proteinmoleküle im elektrischen Feld zur

Anode oder zur Kathode.

Als weitere Technik zur Reinheitsprüfung benützt man die Ultrazentrifuge. Dabei wird geprüft, ob ein Protein in einem sehr hohen Schwerfeld einheitlich sedimentiert (12). Gleichzeitig ergeben sich dabei Aussagen über das Molekulargewicht, über die Form sowie über Größe und Dichte des Proteins. In Ultrazentrifugen werden heute Schwerfelder bis zu 65000 Umdrehungen in der Minute erreicht. Unter dem Einfluß derartiger Schwerfelder wird dabei mit optischen Methoden die Wanderung der zu untersuchenden Substanz in einem Lösungsmittel verfolgt. Enthält eine Proteinlösung noch mehrere Komponenten, so sedimentieren diese unterschiedlich, wenn sie sich in ihren molekularen Eigenschaften unterscheiden. Ein reines Protein sedimentiert einheitlich. Andererseits läßt sich hieraus noch nicht in jedem Fall auf reines Protein schließen, da mitunter auch verschiedene Proteine gleich sedimentieren oder mehrere Proteine miteinander Komplexe bilden und als solche zusammen sedimentieren.

Abb. 26 zeigt ein Sedimentationsdiagramm einer 0,5%igen Kollagenlösung (Präparat Nr. 2 , vgl. S. 34) bei 22°C. Die Kollagenlösung (ca. 1 ml) wurde in eine analytische Zelle gebracht. Die Zelle wurde in den analytischen Rotor eingesetzt. Der Rotor befand sich dann in der Rotorkammer der Ultrazentrifuge (Beckman Modell E) und wurde in Drehung gebracht. Mit Hilfe optischer Verfahren wurden der Inhalt der Zelle während des Zentrifugenlaufes beobachtet und die Vorgänge fotografisch festgehalten (insgesamt 17 Bilder). Da die Grundfläche der Zelle 5,7 cm von dem Mittelpunkt der Rotation und x' cm von der Spitze der Bande bzw. der Grenze auf dem Sedimentationsdiagramm entfernt ist, ergeben sich aus den 17 Bildern folgende Ergebnisse:

s. Tabelle 11 .

Die Werte für $\log x$ in Tabelle 11 wurden gegen die Zeit (t sec.) graphisch aufgetragen (Abb. 27). Die Sedimentationskonstante läßt sich aus folgender Gleichung (47) rechnerisch ermitteln.

$$S = \frac{2,303}{w^2} \cdot \frac{\log x}{t} = \frac{2,303}{\left(2\pi \frac{60000}{60} \right)^2} \cdot \frac{\log x}{t} \quad \text{wobei } w = 2\pi f, \text{ und } f = 60000 \text{ pro Min. ist.}$$

$$\begin{aligned}
 S &= 5,833567 \times 10^{-8} \times 2,489655 \times 10^{-6} \\
 &= 1,4524 \times 10^{-13} \\
 &= 1,45 \text{ Svedberg.}
 \end{aligned}$$

Tabelle 11. Bestimmung der Sedimentationskonstante einer 0,5%igen Kollagenlösung bei 22°C

Bild Nr.	x' (cm)	$x = x' + 5,7 \text{ cm}$	$\log. x$	t (sec.)
1	0,70726	6,4073	0,80668	0
2	0,7176	6,4176	0,80737	480
3	0,7312	6,4312	0,80829	960
4	0,7445	6,4445	0,80919	1440
5	0,7606	6,4606	0,81027	1920
6	0,779	6,479	0,81151	2400
7	0,793	6,493	0,81245	2880
8	0,81278	6,5128	0,81377	3360
9	0,831	6,5310	0,81498	3840
10	0,8495	6,5495	0,81621	4320
11	0,8887	6,5887	0,81880	4800
12	0,876	6,576	0,81796	5280
13	0,9027	6,6027	0,81972	5760
14	0,9214	6,6214	0,82095	6240
15	0,9414	6,6414	0,82226	6720
16	0,9589	6,6589	0,82340	7200
17	0,9775	6,6775	0,82461	7680

Ähnlich gilt die Methode auch für die Bestimmung der Sedimentationskonstante einer 1%igen Kollagenlösung (Präparat Nr. 2).

Stellt man die Werte für $\log. x$ in Tabelle 12 gegen t dar, so wird $\log. x/t = 2,4125 \times 10^{-6}$ erhalten, und die Sedimentationskonstante ist gleich $5,833567 \times 10^{-8} \times 2,4125 \times 10^{-6} = 1,4074 \text{ Svedberg.}$

Fortsetzung auf S. 64

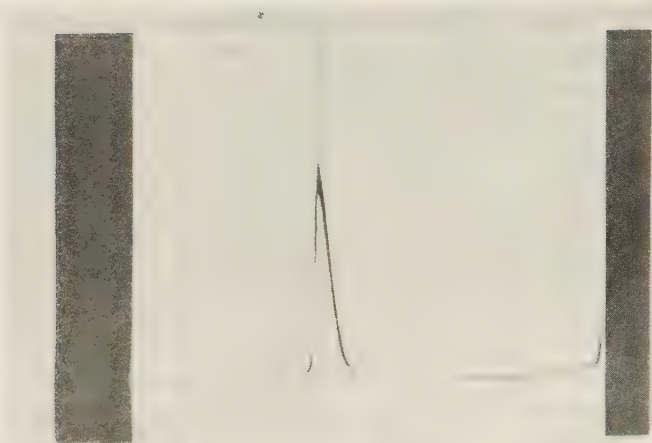


Abb. 26. Sedimentationsdiagramm einer 0,5%igen Kollagenlösung bei 22°C. Die Sedimentationskonstante beträgt einen niedrigen Wert von 1,45 s. Sedimentation geht von links nach rechts.

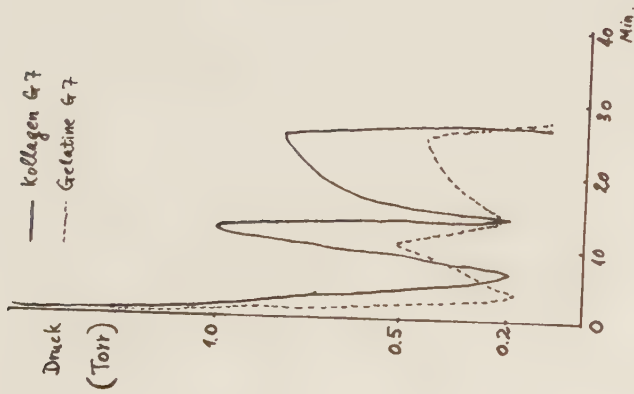


Abb. 28. Die Desorptionsgeschwindigkeiten der Kollagen- und Gelatinepräparate G 7.

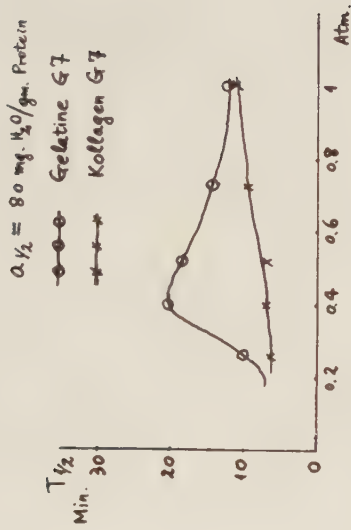


Abb. 31. Halbwertszeiten der verschiedenen Sorptionsstufen.

Untersuchungen der Wasserbindung am Kollagen gaben Migchelsen et al. (43) eine klare Übersicht. (z.B. Die Protonenaustauschzeit war $1,3 \times 10^{-4}$ sec. in einem Kollagenpräparat, das 0,45 g H_2O /g. Prot. enthielt). Susi et al. (64) untersuchten die Kollagenhydratation mit IR-Spektroskopie.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wasserbindefähigkeiten von Kollagen und Gelatine durch die Anwendung eines Gefriertrockners zu vergleichen. Für die Untersuchungen wurden ein Kollagenpräparat Nr. 5 und ein Gelatinepräparat Nr. 10 (vgl.S. 37) verwendet. Die Desorptionsgeschwindigkeiten der Präparate wurden mit Hilfe eines Gefriertrockners (Leybold-Heraeus GT 2) aufgenommen (Abb. 28). Es zeigte sich, daß das Gelatinepräparat auf Grund der Hitzedenaturierung bei der Herstellung eine schwächere Wasserbindefähigkeit besaß als das Kollagenpräparat. Bei Hitzedenaturierung zerfällt die Tripelhelix in einen Knäuel aus Einzelsträngen. Das äußert sich als Verlust an Sekundär/Tertiär- und Quartär-Strukturen mit einer Herabsetzung der Wasserbindefähigkeit. Dieser Befund weist auf einen strukturabhängigen Wassereinbau hin.

Die Aussage, daß das Gelatinepräparat eine schwache Wasserbindefähigkeit besitzt, ist durch die Darstellung der Sorptionsisothermen in Abbildung 29 bestätigt worden, denn bei den folgenden Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Anfangssorptionsgeschwindigkeit des hitzedenaturierten Kollagens (Gelatine) niedriger war als die des nicht-hitzedenaturierten Kollagens. Zur Herstellung der Sorptionsisothermen wurden die getrockneten Präparate von Kollagen und Gelatine gewogen (13,210 bzw. 13,235 mg), die langsam Wasserteilchen der feuchten Umgebung aufnahmen. Die Zunahme des Präparatsgewichts mit der Zeit wurde aufgezeichnet (Tabelle 13):

Die Sorptionsisothermen wurden bei verschiedenem Dampfdruck beispielsweise bei 200, 300, 400 und 550 Torr in Abbildung 30 dargestellt. Da der halbe Wassergehalt einen Wert von ca. 80 mg H_2O /g.Prot. (Tabelle 13) in dieser Arbeit betrug, wurde dieser Wert zur Vergleichung der Sorptionsgeschwindigkeiten der Präparate

Tabelle 13. Die Sorptionsgeschwindigkeiten von zwei Präparaten bei 755 Torr und 23°C

Gelatinepräparat Nr. 10		Kollagenpräparat Nr. 5	
Zeit (Min.)	Wassergehalt (mg H ₂ O/g. Prot.)	Zeit (Min.)	Wassergehalt (mg H ₂ O/g. Prot.)
3	12,5	5	51
12	77	7	61
19	100	11	76
31	124	21	112
42	134	30	128
62	149	43	141
72	154	60	149
102	161	74	154
130	164	101	157
156	165	128	158
196	170	158	162
203	168	195	163
		205	163

genommen, so daß die Halbwertszeiten der Sorptionsisothermen in Tabelle 14 und Abb. 31 aufgetragen werden konnten. Die Halbwertszeit $T_{1/2}$ für Kollagenpräparat Nr. 5 ist oberhalb $p/p_0 = 0,2$ atm. praktisch unabhängig vom Dampfdruck (eine Gerade in Abb. 31), während $T_{1/2}$ bei der Wasseraufnahme des Gelatinepräparats Nr.10 stark p/p_0 -abhängig ist.

Tabelle 14. Die Halbwertszeiten bei verschiedenem Dampfdruck

Dampfdruck		$T_{1/2}$ = Halbwertszeit (Min.)	
Torr	atm.	Gelatinepräparat Nr. 10	Kollagenpräparat Nr. 5
200	0,263	10	6
300	0,395	20	7
400	0,526	18	6
550	0,723	14	9
755	0,994	12	11

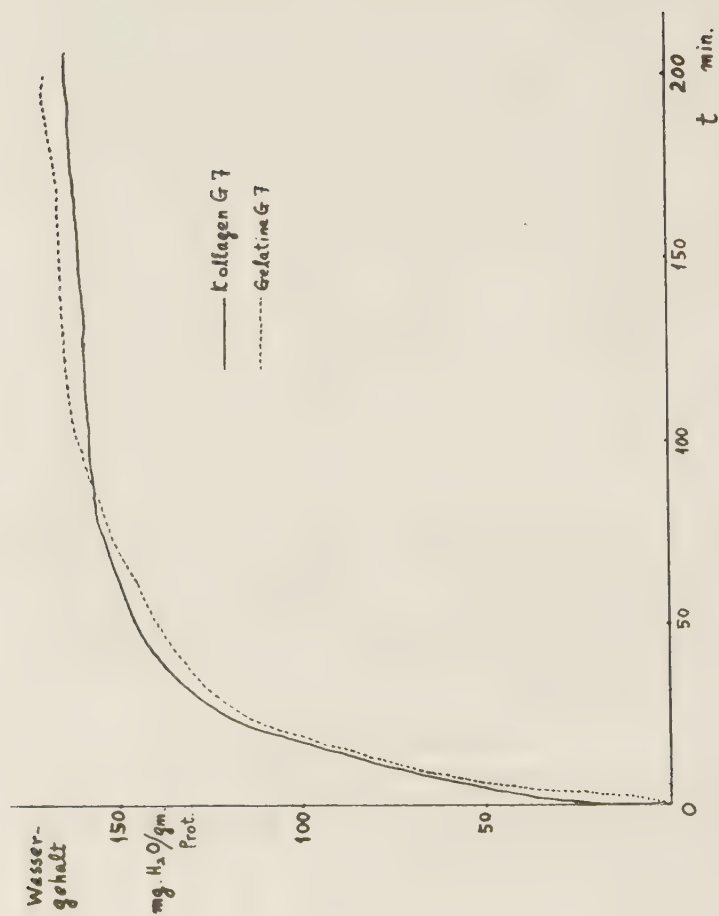


Abb. 29. Die Sorptionsgeschwindigkeiten der Kollagen- und Gelatinepräparate G 7 bei 755 Torr und 23°C.

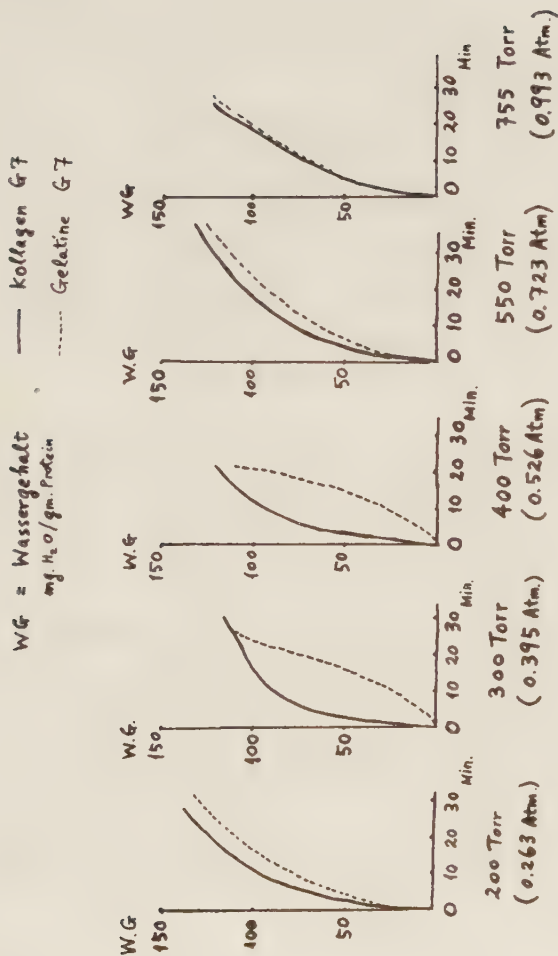


Abb. 30. Die Sorptionsgeschwindigkeiten bei verschiedenem Dampfdruck.

Der Befund, daß $T_{1/2}$ bei der Wasserabsorption des Gelatinepräparats Nr. 10 stark p/p_o -abhängig ist, weist auf einen zweistufigen Wassereinbau in die Helix des hitzedenaturierten Kollagens hin (41). Zufällig zeigt das bereits erwähnte Kollagenstrukturmodell von Ramachandran (55), daß zwei unterschiedlich orientierte HOH-Moleküle pro Tripeptideinheit ($O...HOH...O$ und $O...HO...H-N \begin{smallmatrix} \nearrow \\ H \end{smallmatrix}$) stereochemisch möglich sind.

Es folgt eine weitere Untersuchung der Wasserbindefähigkeit des Kollagens mittels der IR-Spektroskopie. Nun handelt es sich um eine Aufklärung der Typen der Wasserstoffbrücken im Kollagen. Kollagenpräparat Nr. 8 (3,1 mg) wurde mit 1 g. KBr gemischt und in Form einer Tablette gepreßt. Das erste IR-Spektrum wurde gezeichnet (Kurve 1 in Abb. 32). Nach 15 Minuten wurde die zweite Kurve dargestellt. Bei einer Feuchtigkeit von 65% und 90% wurden die dritte und vierte Kurve angefertigt, (s. Kurven 2, 3, 4 und 5 in Abb. 32).

Das Wasser im Präparat Nr. 8 wurde dann mittels eines Gefriertrockners zum großen Teil entzogen und das Präparat wieder gepreßt. Danach wurden Kurven 6, 7 und 8 in Abb. 33 mit zunehmendem Wassergehalt im Präparat angefertigt. Die Ergebnisse ergeben sich aus Tabelle 15.

In dieser Arbeit hat sich erwiesen, daß die Zunahme der Frequenz der N-H Deformationsschwingung in " $N-H...O_w-H$ " mit der Abnahme der Frequenz der O_w-H Streckschwingung in der gleichen Wasserstoffbrücke (d.i. $N-H...O_w-H$) koordiniert ist, denn die Stärke der Wasserstoffbrücke steigt mit zunehmendem Wassergehalt im Kollagen.

Zuletzt soll eine weitere Wasserstoffbrücke erwähnt werden, und zwar die " $C=O...H-N$ " im Kollagen.

Tabelle 15. Feststellung des Einflusses der Wasserstoffbrücke auf den Banden in IR-Spektren eines Kollagenpräparats Nr. 8

Lage	Bemerkungen
3320 cm ⁻¹	Aufgrund der Wasserstoffbrücke N-H...O _w -H und der Amid-A-Bande bei 3320 cm ⁻¹ wurde die Bande der Wasserabsorption (O _w -H Streckschwingung) bei 3420 cm ⁻¹ des Kollagenpräparats zu der niedrigeren Frequenz bei 3320 cm ⁻¹ verschoben. Das äußerte sich in der zunehmenden Stärke der Wasserstoffbrücke bei steigendem Wassergehalt im Präparat.
2940 cm ⁻¹	Die Bande der C-H Streckschwingung vergrößerte sich mit zunehmendem Wassergehalt. Das zeigte die Wasserstoffbrücke von C-H...O _w , wobei w gleich Wasser ist.
1640 - 1620 cm ⁻¹	Bei zunehmendem Wassergehalt wurde die C=O Streckschwingung bei 1640 cm ⁻¹ zu der niedrigeren Frequenz bei 1620 cm ⁻¹ verschoben. Diese Verschiebung war auf die starke Wasserstoffbrücke C=O...H-O _w zurückzuführen (Kurven 1, 2 und 3).
1550 cm ⁻¹	Hier ist die Änderung der Frequenz von großem Interesse. Keine Wasserabsorption war hier zu erwarten, aber die Frequenz der N-H Deformations-schwingung stieg mit zunehmendem Wassergehalt. Dies war auch auf die Wasserstoffbrücke im Kollagen zurückzuführen.

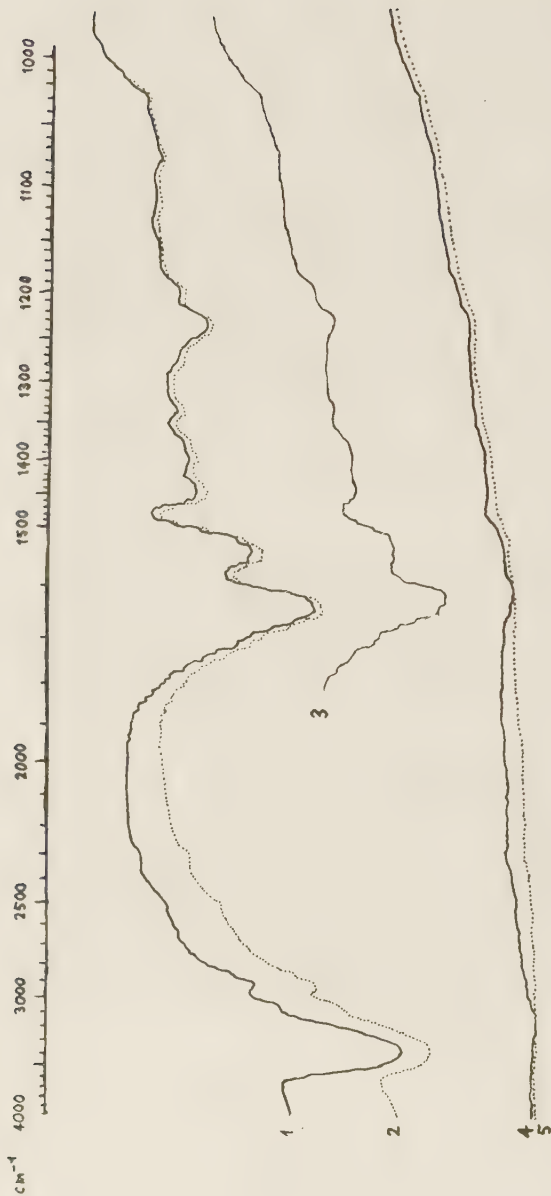


Abb. 32. Infrarot-Transmissionspektren eines Kollagenpräparats, das Wasser enthält.

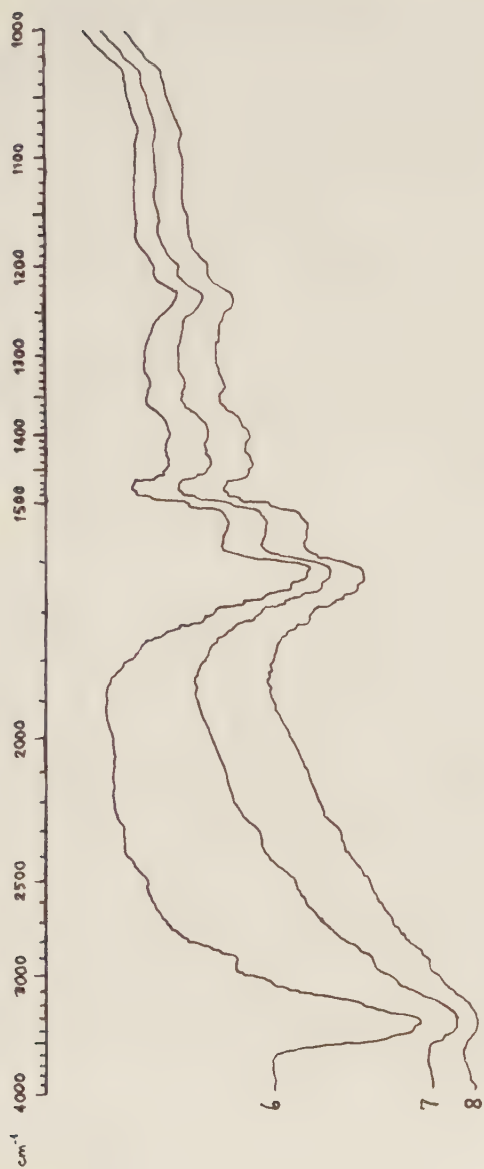


Abb. 33. Weitere Infrarot-Transmissionsspektren eines Kollagenpräparats, das Wasser enthält.

5.6. Tyrosingehalt ---- CM-Cellulose-Säulenchromatographie

Wie auf S.55 erwähnt, ist die Schrumpfung der Kollagenfaser eine Erscheinung der Denaturierung des Kollagens im festen Zustand. Bei Schrumpfung verkürzen sich die Kollagenfibrillen stark. Durch Hitzedenaturierung verliert ein Kollagenpräparat seine raue Oberfläche auch nach dem Abkühlen (S. 37). Stattdessen wird eine glatte Oberfläche gebildet. Gelatine aus Kalbshaut, deren Entstehung auf Hitzedenaturierung zurückzuführen ist, enthält einen höheren Hydroxyprolingehalt als die native Form (S.26). Obwohl Gelatine Wasser bindet wie die native Form, ist das Wasser in der Gelatine nicht so fest gebunden wie das in der nativen Form (S. 66). Bei der Hitzedenaturierung des löslichen Kollagens entstehen die Komponenten α , β und γ (S.58). Durch Disk-Elektrophorese werden sie trennbar gemacht. Sie können auch durch eine Carboxymethylcellulose-Säule getrennt werden, wie Cooper und Davidson (12) dargestellt haben.

Das Ziel der folgenden Arbeit war es, die Fraktionierung des Peptid- und Aminosäure-Gemisches nach Hitzedenaturierung eines Kollagenpräparats an einer CM-Cellulose-Säule durchzuführen. Das Kollagenpräparat J₂ (S. 13) wurde gewogen und in 20 ml destilliertem Wasser erwärmt, bis es gelöst war. Diese Kollagenlösung wurde in eine temperierte (40°C) CM-Cellulose-Säule übertragen, eine Pufferlösung mittels einer Schlauchpumpe an der Säule aufgesetzt und die Ausflüsse aus der Säule mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Nachdem die Fraktionen durch einen Rotationsverdampfer getrocknet worden waren, wurden sie mit 6 N HCl hydrolysiert, bevor die Methode auf S. 16 zur Bestimmung des Hydroxyprolins bzw. Tyrosins durchgeführt wurde. Bei einigen Fraktionen war die Hydrolyse mit 6 N HCl nicht erforderlich. Der Versuch wurde zweimal unternommen. (Tabelle 16).

Fortsetzung auf S. 76

Tabelle 16. Die Arbeitsbedingungen bei den Versuchen der CM-Cellulose-Säulenchromatographie.

	Erster Versuch	Zweiter Versuch
Verwendete Menge des Kollagenpräparats J ₂	37 mg	45 mg
Höchstst erreichte Temperatur bei der Hitzedenaturierung des Präparats	85°C	45°C
Verwendete Menge der CM-Cellulose	0,1 g.	1,97 g.
Pufferlösungen	Lösung 1	Lösungen 1 und 2

Bemerkungen:

Pufferlösung 1 (pH 5) enthielt 0,05 M NaH₂PO₄ und 0,05 M NaCl.

Pufferlösung 2 (pH 10) enthielt 0,05 M NaH₂PO₄, 0,5 M NaCl und 0,06 M NaOH

Tabelle 17. Ergebnisse bei dem ersten Versuch der Säulenchromatographie unter Anwendung der Methode auf S. 16 zur Bestimmung der Lage und Intensität jeder Bande, die durch die Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd hervorgerufen wurde. Bei diesem Versuch war die Hydrolyse der Fraktionen nicht erforderlich.

Fraktion gesammelt	Lage	Bemerkungen
1. - 10. ml	500 nm	Diese Bande zeigte die Anwesenheit von Tyrosin, dessen Entstehung auf die Hitzedenaturierung zurückzuführen war.
11. - 15. ml	500 nm	Die Bande war sehr klein.
16. - 75. ml	500 nm	Hier zeigte die Bande wieder Tyrosin (s. Abb. 3).
76. - 90. ml	560 nm	Hydroxyprolin, Prolin oder Hydroxylysin war vorhanden (vgl. Abb. 3).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse in den Tabellen 17 und 18 wurde folgendes zusammengefaßt: Bei Versuchen zur Trennung der Komponenten löslichen Kollagens durch die Anwendung der CM-Cellulose-Säulenchromatographie konnte festgestellt werden, daß Tyrosin eher als Hydroxyprolin, Prolin oder Hydroxylysin durch die Säule kam. Außerdem wurde festgestellt, daß Tyrosin bei der Hitzedenaturierung zum großen Teil die Molekülketten des Kollagens verläßt.

Tabelle 18. Ergebnisse beim zweiten Versuch

Fraktion gesammelt	Lage	Bemerkungen
1. - 80. ml	500 nm	Tyrosin war vorhanden. Eine Hydrolyse war hier nicht erforderlich.
81. - 160. ml	560 nm	Eine kleine Menge von Hydroxyprolin, Prolin oder Hydroxylysin war vorhanden. Eine Hydrolyse wurde nicht durchgeführt.
161. - 1100. ml	-- 560 nm	Ohne Hydrolyse zeigte sich kein freies Hydroxyprolin, Prolin, Tyrosin oder Hydroxylysin. Nachdem diese Fraktion mit 6 N HCl hydrolysiert worden war, ergab sich auf die Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd eine Bande des Hydroxyprolins, Prolins oder Hydroxylysins (vgl. Abb.3 auf S.19). Dies war auf die Kollagenpeptide zurückzuführen, denn durch die Hydrolyse mit 6 N HCl wurden die Aminosäuren der Peptide frei.

6. AUFBEWAHRUNG VON KOLLAGEN

Beim Gefriertrocknen (Lyophilisation) wird biologisches Material (Bakterien, Viren, Transplantationsmaterial, injizierbare Zellen für Frischzellentherapie, Seren, Gewebe) im Vakuum bei sehr tiefer Temperatur in gefrorenem Zustand das Wasser entzogen, ohne daß es zu einer wesentlichen Schädigung des Materials kommt (1,42). Die Stoffwechsel- und Enzymfunktionen kommen zum Stillstand. Bakterien und Viren bleiben beim Gefriertrocknen als Trockenpräparat nach jahrelanger Lagerung vermehrungsfähig und krankheitserregend.

Das zu gefriergetrocknetem Kollagenpräparat kühlt man rasch auf etwa -20° bis -30°C ab. Bei dieser Temperatur und in einem auf 0,01 Torr evakuierten Gefäß, sublimiert das zu Eis gefrorene Wasser aus dem Präparat heraus. Das getrocknete Präparat kann bei -10°C für lange Zeit aufbewahrt werden.

Die Anwendung der Gefriertrocknung zur Aufbewahrung von Kollagen ist seit einiger Zeit bekannt, aber für den Einsatz eines neuen Konservierungsmittels, --- Phenonip --- in Kollagenlösungen gegen Mikroorganismen, sind bis jetzt in der Literatur noch keine Meßwerte vorhanden. Außerdem ist lösliches Kollagen durch die Verwendung von Konservierungsmitteln jeder Zeit verfügbar. Für einige Untersuchungen, wie beim Ultrazentrifugieren und bei Säulenchromatographie, muß ein gefriergetrocknetes Präparat zuerst in Lösung gebracht werden.

Die Zusammensetzung von Phenonip wurde durch Massenspektrometrie, Gas-Chromatographie, Kernresonanzspektroskopie und Infrarotspektroskopie enthüllt. Die Abbildungen 36 und 37 zeigen den Mechanismus massenspektrometrischer Abbaureaktionen von Phenonip. Unsere Erklärung für die Entstehung wichtiger Spaltprodukte von Phenonip darf von Interesse sein. Die Gas-Chromatographie erwies deutlich die Anwesenheit von Nipagin M in Phenonip (Abb. 38 - 41). Das NMR-Spektrum (Abb. 43) und das IR-Spektrum (Abb. 42)

zeigen die wichtigen funktionellen Gruppen, wie z.B. $\text{CH}_3\text{-O-CO-}$ und H-O-Ar , in Phenonip. Schließlich wurde gefunden, daß ca. 80% an 2-Phenoxyäthanol, ca. 13% an Nipagin M und ca. 7% an sonstigen Estern der 4-Hydroxybenzoesäure (die Äthyl-, Propyl- und Butylester) in Phenonip sind.

Vier Versuche wurden zur Untersuchung der Wirkung von Phenonip gegen Mikroorganismen in Kollagenlösungen durchgeführt. In Tabelle 19 werden die Werte für die Konzentrationen von Phenonip und Tween 80 in Kollagenlösungen angegeben. Während 0,5% Phenonip die Einwirkung von Bakterien verhüten kann, ermöglicht 1,0 Vol.% Phenonip, in 1 bis 2 Tagen Bakterienarten, wie z.B. *Staphylokokkus aureus*, *E.coli*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa* und *Penicillium crustaceum*, abzutöten (6). Deshalb war die Menge von Phenonip in Lösungen N, C und D ausreichend, den Angriff der Bakterien zu verhüten. Kollagenlösungen F_1 und F_2 enthielten auch 0,5% Phenonip, aber die Menge (0,01%) von Tween 80 war unzureichend. Infolgedessen trennte sich Phenonip zum Teil von den Lösungen F_1 und F_2 ab, als sie bei 4°C aufbewahrt wurden, denn Phenonip ist in Wasser schwer löslich.

Tabelle 19. Der erste Versuch der Verwendung von Phenonip in Kollagenlösungen

Kollagenlösung	Konzentration in Lösung	
	Phenonip	Tween 80
N	0,5%	2,5%
F_1 und F_2	je 0,5%	je 0,01%
C und D	je 0,5%	je 3%

In dem zweiten Versuch wurde Vitamin C in die Kollagenlösungen G 7 und G 8 hinzugefügt, die bereits Tween 80 enthielten (Tabelle 20). Das Ziel dieses Versuchs war die Aufklärung der Frage, ob Tween 80 mit Vitamin C zusammenpaßt. Die Kollagenlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Nach einiger Zeit wurde festgestellt,

daß die Farbe der Kollagenlösungen sich von weiß zu gelb änderte. Das deutet an, daß die Oxydation des Vitamins C mit dem Verlust an Tween 80 stattgefunden hat. Folglich ist Tween 80 mit Vitamin C nicht zusammenpassend. Unser Befund bestätigt das Ergebnis von Azaz et al. (2).

Tabelle 20. Der zweite Versuch der Verwendung von Phenonip in Kollagenlösungen.

	Konzentration in Kollagenlösung	
	G 7 (pH 3,1)	G 8 (pH 3,2)
Phenonip	0,3%	0,3%
Tween 80	0,1%	0,09%
Propandiol-1,3	0,1%	--
Propandiol-1,2	--	0,09%
Essigsäure	0,1 M	0,1 M
Citronensäure	0,1 M	0,09 M
Vitamin C	0,1 M	0,09 M

Bei dem ersten und zweiten Versuch wurde zufällig etwa Interessantes gefunden, und zwar die Anwendung der Rasterelektronenmikroskopie in der Untersuchung von Bakterien und Pilzen, denn das Rasterelektronenmikroskop besitzt eine höhere Maximalvergrößerung als das Lichtmikroskop. Die Abbildungen 44 und 45 zeigen offensichtlich eine Art von Bakterium bzw. einen Pilz. Sie zeigen ferner, daß Zentrifugieren bei 4000 Umdrehungen pro Minute nicht zur Entfernung der vorhandenen Bakterien oder Pilze angewendet werden kann. Die Bakterien oder Pilze in Kollagenlösungen können nach Hitzedenaturierung mittels Filtrierens durch feine Poren, beispielsweise Poren mit Durchmesser von 0,3 μm , entfernt werden.

Bei dem dritten Versuch wurde kein Vitamin C verwendet. Dafür

wurde 0,24% Nipagin M in eine Kollagenlösung, die bereits 0,25% an Phenonip, 1,2% an Tween 80 und 0,5% an Propylenglycol enthielt, hinzugefügt. Da man im allgemeinen Nipagin M in 0,05 - 0,25%iger Lösung als Konservierungsstoff verwendet, war die Menge von 0,24% an Nipagin M und 0,25% an Phenonip ausreichend, um den Angriff der Bakterien fernzuhalten.

Der vierte Versuch ist auch erfolgreich durchgeführt worden, weil die Kollagenlösung 0,83% an Phenonip, 3,8% an Tween 80 und 0,1% an Propylenglycol enthielt (6). Außerdem wurde der Eiweißgehalt der Kollagenlösung ständig durch Hydroxyprolin-Bestimmungen kontrolliert.

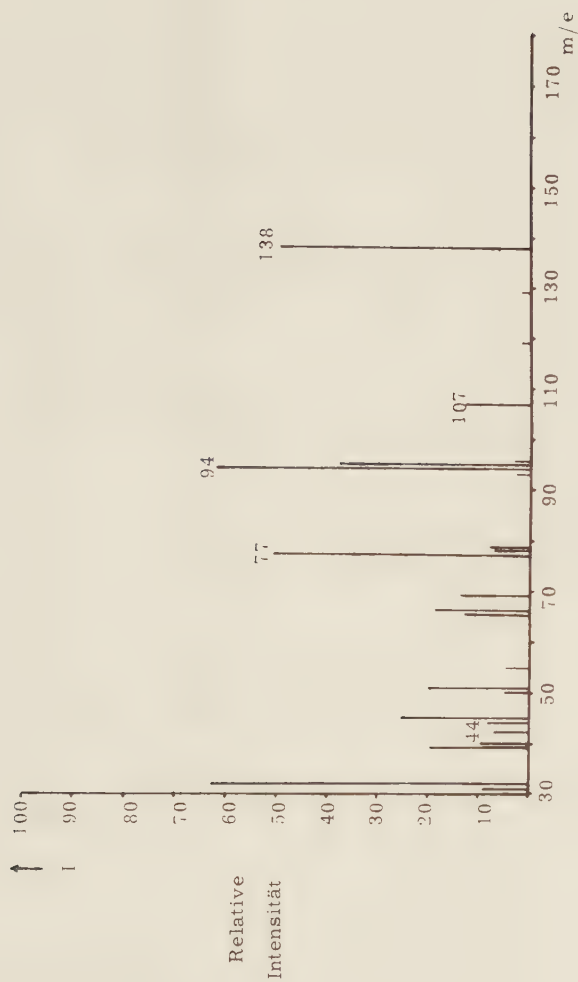


Abb. 34. Massenspektrum von Phenonip bei 200°C.

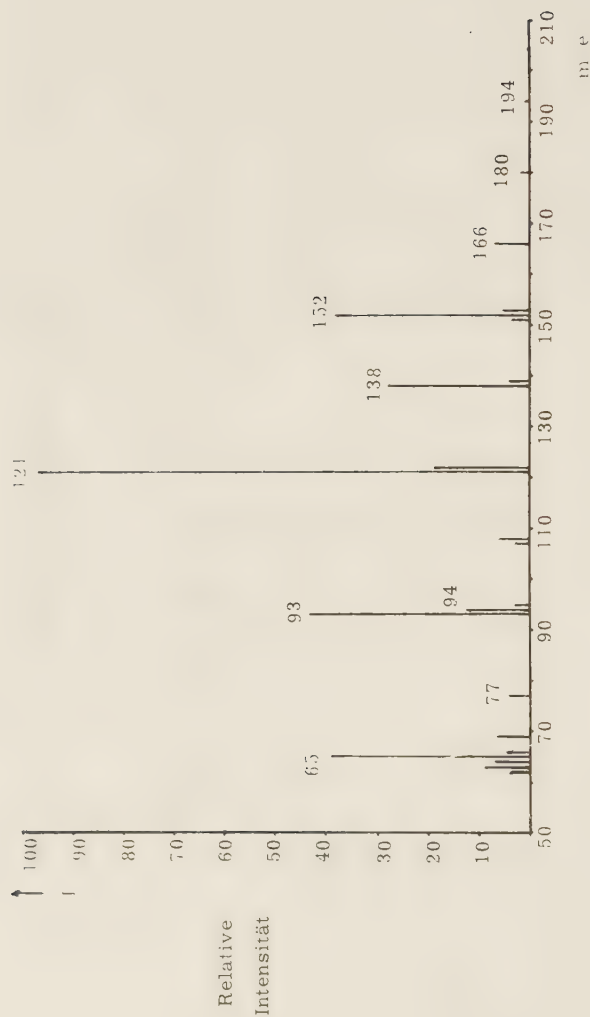


Abb. 35. Massenspektrum von Phenol bei 300°C.

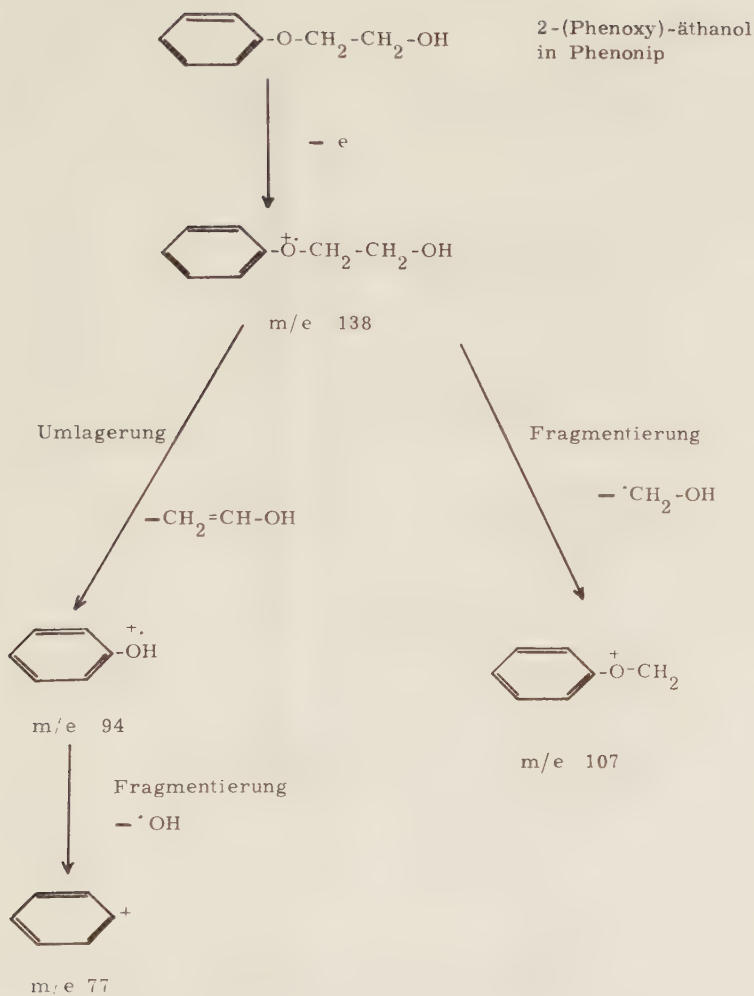


Abb. 36. Der Mechanismus massenspektrometrischer Abbaureaktionen von Phenonip bei 200°C, (vgl. Abb. 34.).

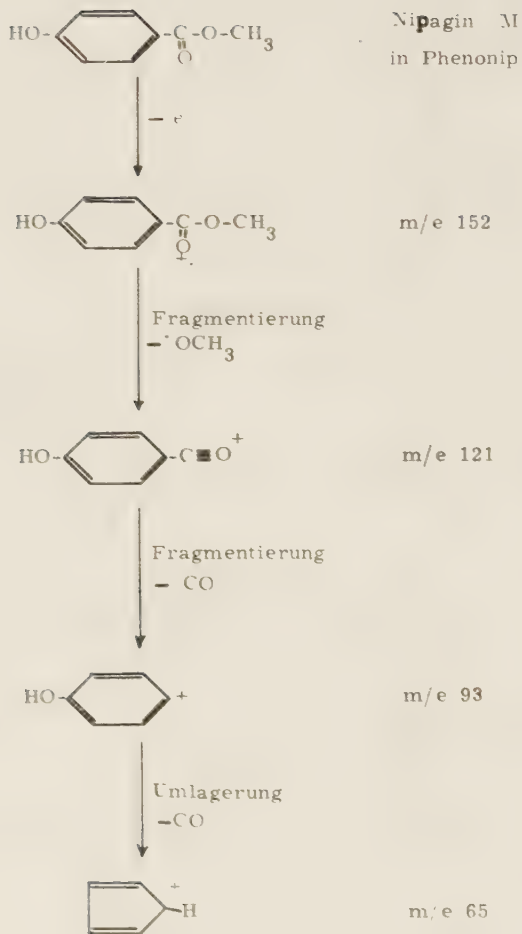


Abb. 37. Der weitere Mechanismus massenspektrometrischer Abbaureaktionen von Phenonip bei 300°C, (vgl. Abb. 35.).

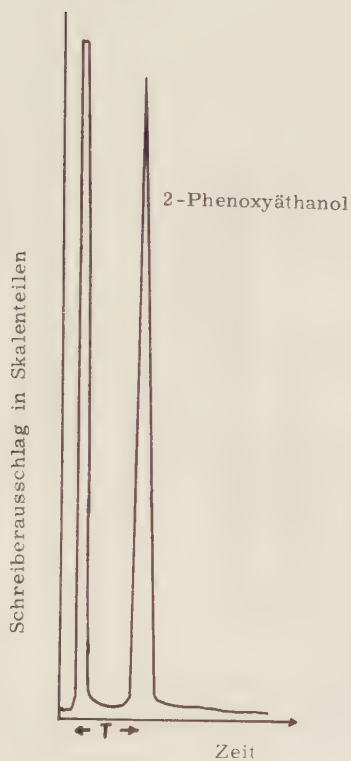


Abb. 38. Gas-Flüssig-Chromatogramm von 2-Phenoxyäthanol. Arbeitsbedingungen : Wärmeleitfähigkeitsdetektor, Säule mit Chromosorb W und 5% SE-30.

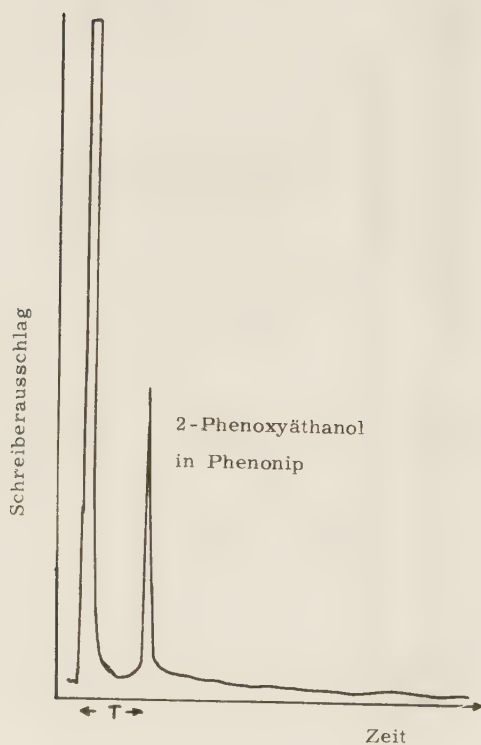
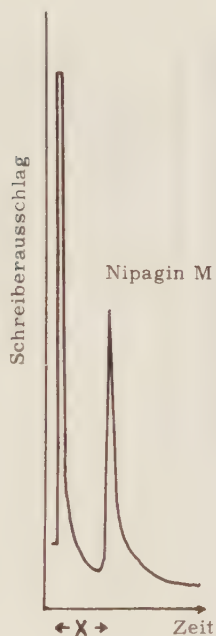


Abb. 39. Gas-Flüssig-Chromatogramm von Phenonip.
Arbeitsbedingungen: Wärmeleitfähigkeitsdetektor,
Säule mit Chromosorb W und 5% SE-30.



0,56 und 1,4 mg/ml
Nipagin M



1,12 mg/ml
Nipagin M

Abb. 40. Gas-Flüssig-Chromatogramm von Nipagin M.
Arbeitsbedingungen: Flammenionisationsdetektor (FID),
Säule mit Chromosorb G und 3% OV-17 .

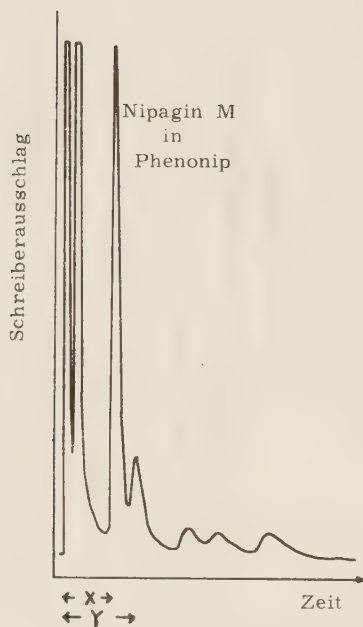


Abb. 41. Gas-Flüssig-Chromatogramm von Phenonip.
Arbeitsbedingungen: FID , Säule mit Chromosorb G
und 3% OV-17.

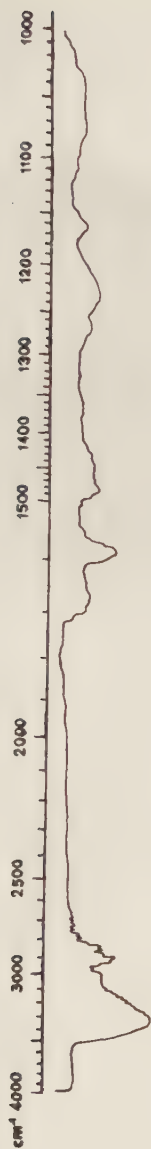


Abb. 42. Infrarot-Transmissionspektrum von Phenonip

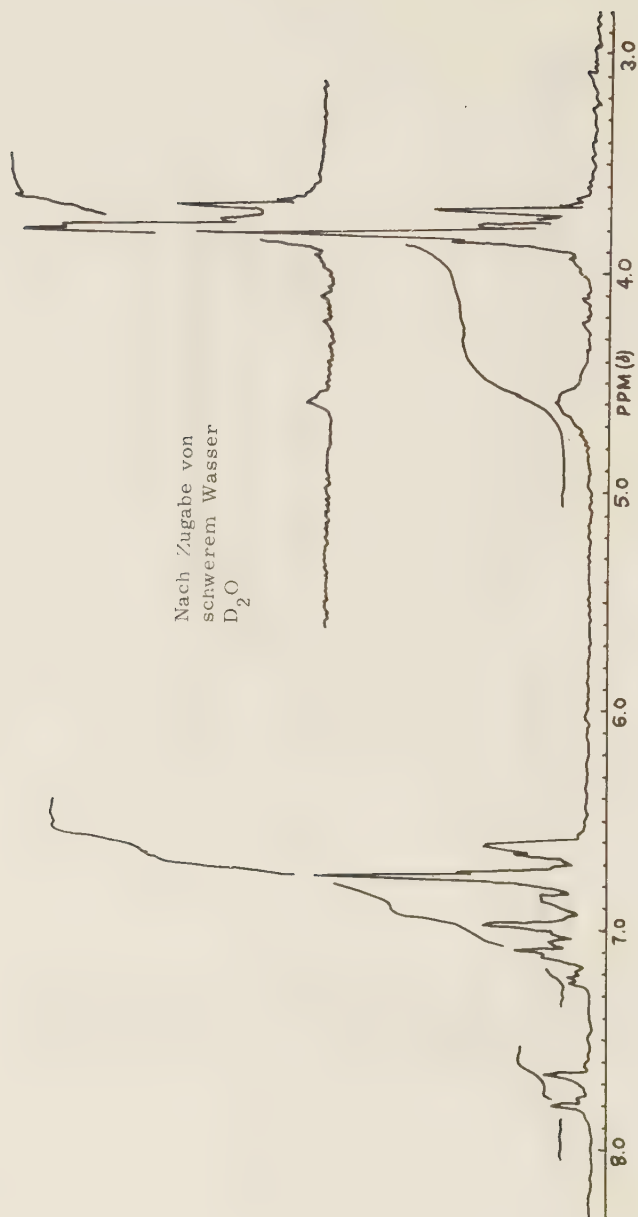


Abb. 43. Kernresonanzspektrum (60 MHz) von Phenonip.

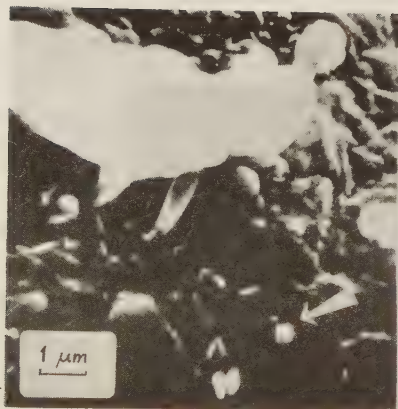


Abb. 44. Ein Rasterelektronenbild mit Kugelbakterien auf der Oberfläche von Kollagen G 7, welches nach Dialyse und Gefriertrocknen von Kollagenlösung G 7 gewonnen wurde. Der durchschnittliche Durchmesser eines Kugelbakteriums ist $0,4 \mu\text{m}$.



Abb. 45. Ein Rasterelektronenbild mit einem Pilz auf der Oberfläche von Kollagen N, welches nach Dialyse und Gefriertrocknen von Kollagenlösung N gewonnen wurde. Der Durchmesser des Pilzes variiert von 2,6 bis 3,8 μm .

7. ZUSAMMENFASSUNG

An Hand der Literatur und eigener Untersuchungen wird hier ausführlich über die Chemie und Eigenschaften des Kollagens berichtet. Eine Betrachtung des Kollagens mit dem Rasterelektronenmikroskop war sehr bedeutungsvoll, da man über das Aussehen der Kollagenoberfläche noch keine genauen Kenntnisse besitzt. Unter anderem werden folgende bisher unveröffentlichte Ergebnisse mitgeteilt:

Für die zur Zeit bekannten Identifizierungsmethoden im Falle löslicher Kollagene wurde mit der Rasterelektronenmikroskopie eine neue Methode angewandt. Im Rahmen vergleichender rasterelektronenmikroskopischer Untersuchung über den Einfluß der Konzentration des Kollagens und der Dauer bei der Dialyse auf der Fibrillenbildung des löslichen Kollagens konnte festgestellt werden, daß die Bildung feiner natürlichen Kollagenfibrillen aus einer Kollagenlösung durch Dialyse mit der Kristallisation einer chemischen Verbindung aus der Lösung durch langsame Verdunstung vergleichbar ist. Um viele feine Kollagenfibrillen durch Dialyse zu bekommen, wurde eine frisch hergestellte Kollagenlösung mit niedriger Konzentration an Kollagen längere Zeit gegen destilliertes Wasser dialysiert. Die Anwendung eines nichtionogenen Netzmittels hatte die Bildung feiner Fibrillen erschwert (S. 34).

Auf einem Rasterelektronenbild befand sich eine Fibrille, die aus 3 feineren, gebündelten Fibrillen bestand. Mehrere zusammengelagerte Fibrillen bildeten sich zu einer Schicht aus (S. 35). Ein nicht-hitzenaturiertes Kollagenpräparat wurde durch seine raue Oberfläche gekennzeichnet, während ein Gelatinepräparat (ein hitzenaturiertes Kollagenpräparat) eine glatte Oberfläche besaß. Infolge der Hitzenaturierung war die Tripelhelix-Struktur des Kollagenmoleküls gebrochen worden. Beim Abkühlen war die Struktur nicht völlig wiederhergestellt worden (S. 37).

Die Kristallbildung von NaCl auf einem Kollagenpräparat kam

durch Gefriertrocknung zustande. Das Aceton hatte nur die NaCl-Kristalle entfernt, die direkt auf den Fibrillen hafteten, und nicht die Kristalle aus den Zwischenräumen (S. 36).

Ein Kollagenpräparat wurde 3 Tage lang mit einer (mit Natriumsulphat gesättigten) 5-prozentigen Natronlauge behandelt. Im Rasterelektronenmikroskop wurde festgestellt, daß die Fibrillenstruktur erheblich beschädigt war. Besonders betroffen waren die Fibrillen auf den Kollagenoberflächen (S. 37). Durch die Behandlung mit Alkali wurden die Amidgruppen des Asparagins und Glutamins der Molekülketten gespalten, und dadurch wurden zusätzlich Carboxylgruppen (-COOH) frei. Die C-O Streckschwingung wurde durch eine Untersuchung mittels der Infrarotspektroskopie gezeigt. Eine Kombination von zwei Verfahrensmethoden, nämlich Rasterelektronenmikroskopie und Infrarotspektroskopie, in der Erforschung von Kollagen ist bis jetzt noch nicht in der Literatur dargestellt worden (S. 47).

Die von einigen Autoren (24, 37) als parallel bezeichneten Faserbündel der Sehne zeigten sich nach Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop als nicht immer parallel, denn das Netzwerk der Kollagenfasern der Sehne konnte durch die Anwendung des Rasterelektronenmikroskops genauer untersucht werden. Ein gefriergetrocknetes Kollagenpräparat der Achillessehne stellte ein ungeordnetes Netzwerk der Kollagenfasern dar (S. 31).

Es wurde nachgewiesen, daß die Rasterelektronenmikroskopie in der bakteriologischen Untersuchung sehr bedeutungsvoll ist. Bakteriologische Verunreinigung wurde in einigen Kollagenlösungen festgestellt, die nicht unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen zur Verhinderung von Bakterienbefall hergestellt wurden (Abb. 44 und 45).

Die für die Identifizierung des löslichen Kollagens unter Anwendung des Aminosäureanalysators ermittelten Meßwerte werden in den Tabellen 2, 3 und 4 zusammengestellt. Angaben relativer Konzentrationen von Hydroxyprolin, Hydroxylysin, Glycin, Alanin, Tyrosin, Methionin

waren für die Identifizierung des Kollagens maßgebend. Nach der Durchführung von sieben der für das Kollagen angewandten Identifizierungsmethoden wurde festgestellt, daß die Gesamtaminosäureanalyse in dieser Hinsicht die sicherste Methode ist. Man hatte bisher nicht beobachtet, daß die Gelatine im allgemeinen höheren Pyrrolidin-gehalt besitzt als das Kollagen (S. 28).

Der Hydroxyprolinegehalt im reinen aschefreien Kollagen lag für Kollagenpräparat Y bei 13,7 Gew.%, für Kollagenpräparat G 7 bei 12,3 Gew.%, für Kollagenpräparat G 8 bei 12,8 Gew.% und für Gelatinepräparat G 7 bei 12,9 Gew.%. Daß der Wert von 14,4 Gew.% als Maßstab des Reinheitsgrads des hergestellten Kollagens gilt, ist nicht völlig richtig. Der Wert für den Hydroxyprolinegehalt dürfte zwischen 12 bis 14 Gew.% liegen (S. 15).

Es wurde gezeigt, daß Gefriertrocknung nach der Dialyse die Unlöslichkeit von Kollagen hervorrufen konnte, wenn das hergestellte Kollagen für lange Zeit mit Tween 80 und Phenonip in der Lösung aufbewahrt worden war. Durch die Anwesenheit einer großen Menge von NaCl war die Wiederlösbarkeit eines gefriergetrockneten Löslichkollagenpräparats gewährleistet (S. 57).

Der Versuch zur Feststellung des maximalen Äquatorreflexes bei der Röntgenstrukturanalyse für die trockene Rattenschwanzsehne ergab in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Lüscher (41) für das getrocknete Löslichkollagen, daß der Wert von $10,6 \text{ \AA}$ für den Abstand zwischen benachbarten trockenen Prototibrillen lag. Eine Aufspaltung von 5° des Äquatorreflexes für die trockene Sehne wurde trotz der schwachen Belichtung des Negativs ermittelt (S. 50).

Bei der Durchführung der Methode der abgeschwächten Totalreflexion (IR-ATR-Technik) lag die Bande der Wasserabsorption bei 3420 cm^{-1} nicht auf der Amid-A-Bande des Kollagenpräparats bei 3230 cm^{-1} . Ähnlich wurde die Bande bei 1620 cm^{-1} nicht von der Bande der Wasser-Deformationsschwingung bei 1640 cm^{-1} gestört.

Das war der Vorteil der ATR-Technik gegenüber den üblichen Verfahren der reinen Transmissionsmessung (S. 48).

Zur Trennung der Komponenten von Kollagen durch die Anwendung von Disk-Elektrophorese konnten eine Fraktion im Kollagenpräparat Nr. 3 und zwei Fraktionen in Kollagenpräparaten Nr. 5 und Nr. 6 beobachtet werden. Die Bedeutung lag darin, daß die hier hergestellten Kollagenpräparate (neutralsalzlösliches oder säurelösliches Kollagen) unterschieden werden konnten (S. 59).

Der Gefriertrockner wurde zur Untersuchung der Wasserbindefähigkeit von Kollagen und Gelatine angewandt. Die Anfangssorptionsgeschwindigkeit des hitzedenaturierten Kollagens war niedriger als die des nicht-hitzedenaturierten Kollagens. Diese Feststellung dürfte eine Verbesserung der Aussage von Lüscher et al. (41) sein, da die Autoren nur Sorptionsgeschwindigkeit angegeben hatten (S. 66).

Bei Versuchen zur Trennung der Komponenten löslichen Kollagens durch die Anwendung der CM-Cellulose-Säulenchromatographie konnte ermittelt werden, daß Tyrosin eher als Hydroxyprolin, Prolin oder Hydroxylysin durch die Säule kam. Folglich ergab sich daraus, daß Tyrosin bei der Hitzedenaturierung zum großen Teil die Molekülketten des Kollagens verläßt (S. 76).

Ausführliche Laboratoriumsvorschriften zur Herstellung löslicher Kollagene (22 Kollagenpräparate insgesamt) werden mitgeteilt. Ein Beispiel der schönen Kollagene war Kollagenpräparat Nr. 1 , weil es die native und zugleich fiberige Gestalt besaß (S. 13 und 34).

Die Auflösungsgeschwindigkeiten des Kollagens in 0,1 M Essigsäure und 0,1 M Natriumcitratpuffer , pH 3,7 , wurden verglichen. Nach 24-stündiger Behandlung der zerriebenen Kalbshaut mit 0,2 M NaCl-Lösung, pH 7,4 , wurde das Gewebe mit Eiswasser gewaschen und mit 0,1 M Essigsäure bzw. 0,1 M Natriumcitratpuffer versetzt. Es zeigte sich, daß nach ca. 4 Stunden eine größere Menge von Kollagen in der 0,1 M Essigsäure gelöst wurde als im 0,1 M Natriumcitratpuffer.

0,1 M Essigsäure besaß also eine größere Lösungsfähigkeit für Löslichkollagen als 0,1 M Natriumcitratpuffer mit pH 3,7 .

Die Sedimentationskoeffizienten von 2 Kollagenlösungen wurden unter Anwendung der analytischen Ultrazentrifuge ermittelt. Es wurde dabei gefunden, daß die Kollagenlösung mit nicht-hitzedenaturiertem Kollagen einen relativ kleinen Sedimentationskoeffizient besaß (S. 64).

Die Methode nach Neuman und Logan (46) war eine Bestimmungsmethode des im Kollagenhydrolysat enthaltenen Hydroxyprolins, ohne daß die anderen Aminosäuren vorher entfernt wurden. Den Autoren war entgangen, daß DL- δ -Hydroxylysin nach der gleichen Behandlung wie Hydroxyprolin eine Farbe bildete, die ein sichtbares Spektrum besaß wie Hydroxyprolin; allerdings war die Farbintensität kleiner als die von Hydroxyprolin, und der Anteil an Hydroxylysin im Kollagen war nicht hoch. Das Zwischenprodukt bei der Oxydation von DL- δ -Hydroxylysin mit 6% H_2O_2 war vermutlich Δ^1 -Pyrrolin-5-carbonsäure (S. 21) .

Bei der Bestimmung des Hydroxyprolingehalts im Kollagen spielte die Temperatur von 40°C bei der Oxydation mit 6% H_2O_2 keine besondere Rolle. Die Behauptung von Leach A.A. (39) war unwesentlich. Als nach der auf S. 16 angegebenen Bestimmungsvorschrift für Hydroxyprolin gearbeitet wurde, reagierte die 6%ige H_2O_2 bei 70°C schneller als bei 40°C. Für jede Hydroxyprolin-Bestimmung sollte eine Eichkurve graphisch dargestellt werden. Es wurde festgestellt, daß die Eichkurven in den meisten Fällen nicht völlig geradlinig verliefen (S. 18).

Zur Feststellung von L-Tyrosin in einer Lösung wurde die Hydroxyprolin-Bestimmungsmethode auf S. 16 angewandt. Nach der Farbbildung am Ende der Bestimmung wurde ein sichtbares Spektrum dargestellt. Die Anfertigung eines sichtbaren Spektrums ist erforderlich, um L-Tyrosin und L-4-Hydroxyprolin zu differenzieren

(vgl. Abb. 3 auf S. 19 und 20), da ihre Oxydationsprodukte am Ende der Bestimmung eine ähnlich rötliche Farbe bilden.

Die Anwendung der Biuret-Methode zur Bestimmung des Kollagengehalts in einer Kollagenlösung erwies sich nach Versuchen mit den 0,3- und 0,45%igen Kollagenlösungen nur von geringer Bedeutung, denn der Fehler der ermittelten Werte betrug $\pm 10\%$.

Das zur Aufbewahrung löslichen Kollagens verwendete Konservierungsmittel Phenonip, konnte mit ca. 80 Gew.% 2-Phenoxy-äthanol, ca. 13 Gew.% Nipagin M und ca. 7 Gew.% sonstiger Ester der 4-Hydroxybenzoesäure in der Zusammensetzung nachgewiesen werden. Nipagin M ließ sich leicht aus Phenonip chromatographisch (GLC) abtrennen. Bei der Trennung wurden ein Flammenionisationsdetektor und eine Säule mit 3% OV-17 angewandt. Diese Arbeitsvoraussetzung waren wirksamer als die mit dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor und einer Säule, die 5% SE-30 enthielt. SE-30 war unpolar, während OV-17 eine Mittelpolarität besaß. Folglich veranlaßte mich OV-17 zur Trennung der in Phenonip sich befindenden vier Alkylester der 4-Hydroxybenzoesäure (S. 88).

Phenonip zeigte in den Kollagenlösungen unter Verwendung ausreichenden Netzmittels, beispielsweise Tween 80, große Wirksamkeit gegen Mikroorganismen. Diese Feststellung war auf die Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts in der Kollagenlösung zurückzuführen (S. 16 und 80).

Der Mechanismus massenspektrometrischer Abbaureaktionen von Phenonip wurde dargestellt. Die Erklärung der Entstehung wichtiger Spaltprodukte von Phenonip dürfte von Interesse sein (S. 84).

8. LITERATURVERZEICHNIS :

1. Andersen C.A., Methods of Biochem. Analysis, 15, (1967), 223.
2. Azaz et al., The Pharmaceutical Journal, 211, (1973), 15.
3. Bailey A.J., Comprehensive Biochem., 26B, (1968), 412.
4. Banga, Z. Alternsforsch., 25, (1972), 254.
5. Blumenkrantz N und Prockop D., Analytical Biochemistry, 39, (1971), 60.
6. Boehm et al., Kosmetik und Aerosole, 44, (1971), 997.
7. Bowes J.H. und Elliott R.G., Biochem. J., 61, (1955), 147.
8. Butler W.T., Biochemistry 9, (1970), 44.
9. Clark und Veis, Biochemistry, 11, (1972), 494.
10. Cooper D und Davidson R., Biochem. J., 97, (1965), 139.
11. Cooper D und Davidson R., Nature, 217, (1968), 168.
12. Cooper D und Davidson R., J. Chromatog., 27, (1967), 488.
13. Delbridge et al., Gerontologia, 18, (1972), 170.
14. Dreißig W., Hosemann R. und Nemetschek Th., Z. Naturforsch. 290, (1974), 516.
15. Durand M. und Favard P., Die Zelle, Friedr. Vieweg Verlag, 1970, 77.
16. Eastoe, Biochem. J., 65, (1957), 365.
17. Everitt, Gerontologia, 17, (1971), 99.
18. Fahrenfort, Spectrochim. Acta, 17, (1961), 698.
19. Finlay J.B. und Hunter J.A.A., Scanning Electron Microscopy, IIT Research Institute, Chicago, Illinois, 1973, 77.
20. Francois C. und Glimcher M.J., Biochem. J., 102, (1967), 148.
21. Franzblau C., Extracellular and Supporting Structures, Comprehensive Biochemistry, 26C, (1971), 659.
22. Grassmann und Mitarbeiter, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, 23, (1965), 196.
23. Gross J, J. Exp. Medicine, 107, (1958), 265.
24. Gross J., Sci. Am., 204, (1961), 120.

25. Hähnel H., Z. Alternsforsch. 27, (1973), 179.
26. Harkness et al., Biochem. J., 56, (1954), 558.
27. Haynes R.H. und Hanawalt P.C., The Molecular Basis Of Life, Freeman and Co., California, 1968, 18.
28. Hörmann H, Leder 11, (1960), 173.
29. Hörmann H, Leder 13, (1962), 79.
30. Hofecker et al., Gerontologia, 18, (1972), 28.
31. Holmes I und Fyfe F.W., Scanning Electron Microscopy, IIT Research Institute, Chicago, 1971, I 345.
32. Irreverre et al., J. Am. Chem. Soc., 85, (1963), 2824.
33. Jackson D.S. und Cleary E.G., Methods of Biochem. Analysis, 15, (1967), 33.
34. Kakac, Handbuch der Kolorimetrie, 3, (1966), 194.
35. Kühn K., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., 333, (1963), 209.
36. Kühn K. und Zimmermann B., Biochemische Zeitschrift, 344, (1966), 123.
37. Kühn K., Chemie in Unserer Zeit, 8, (1974), 97.
38. Kulonen E., Rheumatoid Arthritis, Academic Press, 1971, 89.
39. Leach A.A., Biochem. J., 74, (1960), 70.
40. Leuthardt, Lehrbuch der Physiologischen Chemie, W. Grueter & Co. Berlin, 1963, 84.
41. Lüscher M. et al., Chimia 27, (1973), 114.
42. Mackenzie A.P., Scanning Electron Microscopy, IIT Research Institute, Chicago, Illinois, 1972, 273.
43. Migchelsen C. et al., The Journal of Chemical Physics, 59, (1973), 296.
44. Miller A. und Parry D.A.D.J. Mol. Biol., 75, (1973), 441.
45. Nemetschek Th. und Hosemann R., Kolloid Z. und Z. Polymere, 251, (1973), 1046.
46. Neuman und Logan., J. Biol. Chem., 184, (1950), 299.
47. Neurath H., The Proteins, Academic Press, 1965, 59.
48. Nitschmann, Pharmazeutische Zeitung, 42, (1968), 1597.

49. Ogle, J.D. und Logan M.A., J. Biol.Chem., 237, (1962), 3667.
50. Orekhovich V.N. und Shpikiter, Science, 127, (1958), 137.
51. Orekhovich V.N., (Doklady), Acad.Sci. (USSR), 60, (1954) 837.
52. Piez et al., Biochim. Biophys. Acta, 53, (1961), 596.
53. Piez K., J.Biol.Chem., 235, (1960), 1989.
54. Prockop et al., Biochim. Biophys. Acta, 83, (1964), 189.
55. Ramachandran G.N., Biopolymers, 6, (1968), 1649.
56. Rich et al. Nature, 176, (1955), 915.
57. Riemschneider R. und Riedel E., Angew. Makromol.Chem., 16/17, (1971), 349.
58. Riemschneider R. und Gross D., J. Chromatogr. 77, (1973), 218.
59. Robert et al., Gerontologia, 17, (1971), 66.
60. Rubin A.L., Biochemistry 4, (1965), 185.
61. Schwarz W., Rasterelektronenmikroskopie, Pressedienst Wissenschaft FU Berlin 2, (1974), 4.
62. Segal J. et al., Die Struktur Biologisch Aktiver Eiweiße, 1966, 113.
63. Steven F.S. und Tristram, Biochem. J., 83, (1962), 240.
64. Susi H., Ard J.S. und Carroll R.J., Biopolymers 10, (1971), 1597.
65. Veis, J. Biol.Chem., 240, (1965), 3905.
66. Verzar, Gerontologia, 15, (1969), 233.
67. Verzar, Gerontologia, 19, (1973), 129.
68. Wallhäußer K.H., Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1967, 202.
69. Wilhelm S., Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Akademische Verlagsgesellschaft, 1967, 26.

LEBENS LAUF

Am 12. Oktober 1945 wurde ich in Canton, China, als Sohn des Kellners Hung Chik und seiner Ehefrau Dipyin, geb. Lo, geboren. Meine 1950 begonnene Schulzeit schloß ich in Hongkong am 15. Juni 1965 mit der Reifeprüfung ab. Am 1. September 1965 begann ich das Studium der Chemie an der Chinesischen Universität Hongkong und erreichte das erste Studienziel mit der Ablegung der B.Sc-Prüfung (Diplom-Vorprüfung) am 15. Juni 1968. Vom 1. August 1968 bis 15. Juni 1970 war ich an der Chinesischen Universität Hongkong als Tutor beschäftigt. Seit dem 1. Oktober 1970 erhalte ich dankend ein Stipendium von dem DAAD (Deutschen Akademischen Austauschdienst) und studiere ich an der Freien Universität Berlin. Nach Ablegung der Diplomprüfung am 1. März 1973 begann ich unter der Anleitung meines Doktorvaters, Herrn o. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Riemschneider, meine Doktorarbeit auf dem Gebiet der Biochemie.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Prof. Dr.:

G. Bourwieg, H. Bradaczek, W. Franke, R. Frydrych, R. Herbst, W. Hirschwald, D. Rewicki, E. Riedel, R. Riemschneider, G. Ruban, H. P. Stock, B. Thomas und A. Willgallis.

Weiterhin danke ich herzlich Frau D. v. Hase, Herrn E. Manthei, Herrn Dr. G. Wehr und Herrn Dr. P. Herzog, die mich durch Hinweise und Ratschläge unterstützt haben.

